UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN VERLAUF DER LICHTABHÄNGIGEN CAROTINOIDSYNTHESE VON FUSARIUM AQUAEDUCTUUM

ELMAR BINDL

MÜNCHEN

1968

Untersuchungen über den Verlauf der lichtabhängigen Carotinoidsynthese von Fusarium aquaeductuum.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Elmar Bindl
aus
Straubing

Mai 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Priv.Doz.Dr.W.Rau
2. Berichterstatter: Prof.Dr.L.Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 23.7.1968

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

INHALTSVERZEICHNIS

Seite:

A. EINLEITUNG 1

B. MATERIAL und METHODEN 6

1. Anzucht des Pilzes 6
2. Versuchsansatz und Versuchsdurchführung 7
3. Extraktion der Farbstoffe 8
4. Auftrennung des Farbstoffs durch Phasenverteilung 9
5. Trennung der einzelnen Farbstoffkomponenten mit Hilfe der Säulenchromatographie 10
6. Versuche zur Abtrennung der Sterine 13

C. VERSUCHE und ERGEBNISSE 15

1. Identifizierung der einzelnen Farbstoffkomponenten 15
2. Carotinoidsynthese im Dunkeln 20
3. Verlauf der Carotinoidsynthese nach Lichtinduktion 23
4. Die Wirkung von Diphenylamin auf die Bildung der einzelnen Carotinoide 28
5. Der Einfluß des Lichtes auf die Bildung von Sterinen 35
6. Die Wirkung von Actidion (Cycloheximid) auf die Bildung der einzelnen Komponenten des Carotinoidgemisches 38
7. Bildung der einzelnen Carotinoide bei Ersatz der Lichtinduktion durch Chloromercuribenzoat 43

D. DISKUSSION 46

E. ZUSAMMENFASSUNG 53

F. LITERATURVERZEICHNIS 56

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0045

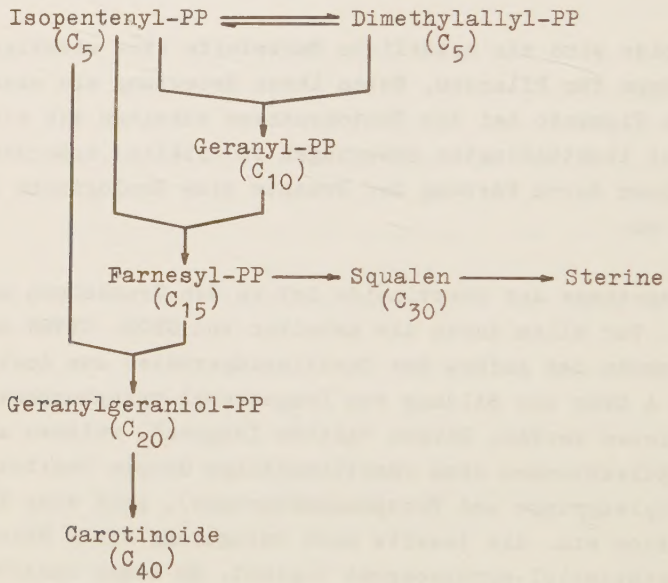
A. EINLEITUNG

Carotinoide sind als natürliche Farbstoffe eine wichtige Stoffgruppe für Pflanzen. Neben ihrer Bedeutung als akzessorische Pigmente bei der Photosynthese scheinen sie eine Rolle bei lichtbedingten Bewegungen zu spielen; außerdem kommt ihnen durch Färbung der Früchte eine ökologische Bedeutung zu.

Die Biosynthese der Carotinoide ist in den Grundzügen aufgeklärt. Vor allem durch die Arbeiten von GROB, LYNEN und BLOCH konnte der Aufbau des Carotinoidgerüstes aus Acetyl-Coenzym A über die Bildung von Isopentenyl-pyrophosphat nachgewiesen werden. Dieses "aktive Isopren", welches an beiden Molekülenden eine reaktionsfähige Gruppe besitzt (Exomethylengruppe und Pyrophosphatgruppe), geht eine Kettenreaktion ein, die jeweils nach Umlagerung eines Moleküls zum Dimethylallyl-pyrophosphat beginnt. Es kommt zunächst zu einer C_{10}-Verbindung, dem Geranyl-pyrophosphat, welche mit einem weiteren Molekül Isopentenyl-pyrophosphat durch Kopf-Schwanz-Kondensation zu dem C_{15}-Körper Farnesyl-pyrophosphat führt.

Dieser Aufbauprozeß der Isoprenaneinanderreihung könnte theoretisch uneingeschränkt weiterlaufen, wie es bei der Kautschukbildung von Hevea brasiliensis der Fall ist. Bei den Mikroorganismen bricht diese Polymerisation entweder auf der Stufe des C_{15}-Körpers Farnesyl-pyrophosphat ab, was zur Squalen- und Sterinsynthese führt, oder sie geht weiter bis zur C_{20}-Stufe, dem Geranylgeraniol-pyrophosphat; dieses wird dann spiegelbildlich zum C_{40}-Körper der Carotinoide dimerisiert. Infolge dieser Spiegelbildkondensation kommt es zu der irregulären

1,6-Stellung ("Schwanz-Schwanz-Kondensation") der Isoprenreste in der Mitte des Carotinoidmoleküls.



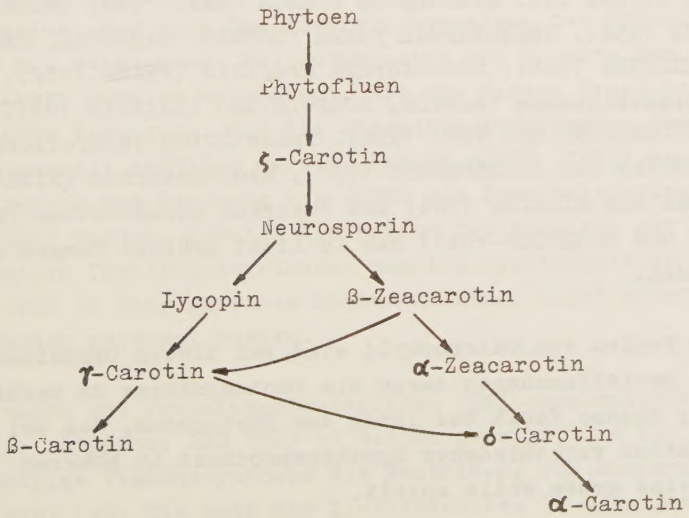
Zwischen Carotinoidbildung und Sterinbildung besteht demnach ein enger Zusammenhang: beide Vorgänge durchlaufen bis zur C_{15}-Stufe denselben Biosyntheseweg. Als letzte gemeinsame Vorstufe kann Farnesyl-pyrophosphat entweder zum C_{30}-Körper Squalen dimerisiert werden oder durch Anlagerung eines weiteren Moleküls Isopentenyl-pyrophosphat über die C_{20}-Stufe zur Carotinoidbildung weiterführen.

Für den weiteren Syntheseweg stellten PORTER und LINCOLN (1950) auf Grund ihrer Versuche an Tomaten eine Hypothese auf, in

der angenommen wird, daß die einzelnen Carotinoide durch schrittweise Dehydrierung, Ringbildung und Oxydation aus dem ersten, noch relativ gesättigten C_{40}-Körper, dem Phytoen, entstehen.

GOODWIN (1951); MACKINNEY (1952); GOODWIN, JAMIKORN und WILLMER (1953); ZALOKAR (1954); KRZEMINSKI und QUACKENBUSH (1960) sowie VILLOUTREIX (1960) stimmen auf Grund ihrer Versuche dieser PORTER-LINCOLN-Hypothese nicht zu. Sie nehmen statt einer stufenweisen Bildung eines Carotinoides aus dem anderen eine unabhängige Parallelsynthese aus einer gemeinsamen Vorstufe an.

PORTER und BEELER konnten in späteren Arbeiten (1962, 1963) durch Einbau von C^{14}-markierten Verbindungen in Tomatenplastiden die Synthesereihe Phytoen → Phytofluen → ζ-Carotin → Lycopin → ß-Carotin erneut wahrscheinlich machen. Auf Grund der neueren Befunde haben PORTER und ANDERSON (1962) das ursprüngliche Schema in folgender Weise neu formuliert:



Der PORTER'schen Hypothese haben sich inzwischen die meisten Autoren, wenn auch nicht in allen Einzelheiten, angeschlossen (Zusammenfassung bei PORTER und ANDERSON 1967). Nur KARUNAKARAN und QUACKENBUSH (1966) bezweifeln sie neuerdings wieder.

Bei vielen Pflanzen wird die Carotinoidsynthese durch Licht gefördert. Das Licht spielt dabei in den meisten Fällen nur die Rolle eines Auslösers, die Synthese erfolgt auch in anschließender Dunkelheit. Diese Lichtförderung der Carotinoidsynthese ist ein Beispiel für die im Pflanzenreich weitverbreitete Regulation von Synthese- und Entwicklungsvorgängen durch Außenfaktoren.

Zur Aufklärung des Mechanismus einer derartigen Regulierung eignen sich besonders solche Organismen, bei denen der entsprechende Vorgang im Dunkeln nur in sehr geringem Umfang abläuft und erst durch Licht ausgelöst wird. Dies ist im Falle der Carotinoidsynthese bei einigen Mikroorganismen verwirklicht; so bilden z.B. Neurospora crassa (HAXO 1949, ZALOKAR 1955, GROB 1958), Rhodotorula rubra (BONNER, SANDOVAL, TANG und ZECHMEISTER 1946), Rhodotorula gracilis (PRAUS 1952), Phycomyces blakesleeanus (GARTON, GOODWIN und LIJINSKY 1951, MAKKINNEY, CHICHESTER und WONG 1954), Penicillium sclerotiorum (MASE, RABOURN und QUACKENBUSH 1957), Mycobacterium (RILLING 1962, BATRA und RILLING 1964) und Fusarium aquaeductuum (EBERHARD, RAU und ZEHENDER 1961) nur im Licht größere Mengen an Carotinoiden.

Durch das Fehlen von Chlorophyll sind bei diesen Organismen keinerlei Beeinflussungen durch die Photosynthese zu berücksichtigen; ebenso fehlt bei ihnen das Phytochrom, das bei der Lichtinduktion verschiedener Syntheseprozesse in höheren Pflanzen eine große Rolle spielt.

Gerade bei den angeführten Bakterien und Pilzen wurde deshalb in den letzten Jahren versucht, den Mechanismus der Regulation dieser Carotinoidsynthese durch Licht aufzuklären.

In neueren Untersuchungen fand RAU (1967 a) bei Fusarium aquaeductuum, daß bei Glukosefütterung auch im Dunkeln geringe Mengen an Carotinoiden gebildet werden; demnach läuft bei Fusarium die Carotinoidsynthese auch ohne Lichtinduktion in geringem Umfang ab. GROB (1959) konnte an Neurospora nachweisen, daß im Dunkeln die Carotinoidproduktion nur bis zu den schwach gefärbten Carotinoiden verläuft; die Bildung der stärker gefärbten Komponenten erfolgt erst nach Belichtung und zwar in der Reihenfolge ihres abnehmenden Sättigungsgrades (PORTER-LINCOLN-Reihe). GROB vermutet deshalb, daß die Lichtwirkung in der Aufhebung einer Blockierung bei der Dehydrierung farbloser oder schwach gefärbter Polyene besteht.

Bei Untersuchungen über den Verlauf der Farbstoffbildung nach Belichtung fanden EBERHARD, RAU und ZEHENDER (1961) bei Fusarium, daß sich das Absorptionsmaximum des Pigmentextraktes mit zunehmender Belichtungszeit vom kürzer- zum längerwelligen Bereich verschiebt. Die aus diesem Ergebnis abgeleitete Vermutung, daß die einzelnen Komponenten verschieden schnell gebildet werden, konnte BÖHME (1962) bestätigen. Da jedoch die Versuche von BÖHME mit Dauerbelichtung durchgeführt wurden, konnten die beiden Teilschritte der lichtabhängigen Carotinoidsynthese, nämlich Lichtinduktion und die dadurch in Gang gesetzte Pigmentbildung, nicht scharf voneinander getrennt werden.

Versuche mit Proteinsynthesegiften (Chloramphenicol: RILLING 1964; Actidion: RAU 1967 b) hatten gezeigt, daß für die lichtabhängige Pigmentsynthese die Neubildung von Enzymen Voraussetzung ist. Die nach der Lichtinduktion in Gang gesetzte

Enzymbildung wird durch diese Proteinsynthesegifte unterbrochen; sind jedoch die Enzyme bereits gebildet, dann läßt sich die Pigmentproduktion durch das Gift nicht mehr hemmen.

Für die weitere Analyse ergibt sich auf Grund der bisher gewonnenen Kenntnisse eine wichtige Frage, auf deren Beantwortung sich die vorliegende Arbeit konzentriert: An welcher Stelle in der Biosynthesekette greift das Licht ein? Dabei treten mehrere Teilprobleme auf: Verläuft die Farbstoffbildung im Dunkeln bis zu einem bestimmten Punkt der Synthesereihe? Ergeben sich Anhaltspunkte für eine parallele Synthese aus einer gemeinsamen Vorstufe oder erfolgt die Farbstoffbildung in einer schrittweisen Sequenz im Sinne des PORTER-LINCOLN-Schemas? Wirkt eine Belichtung außer auf die Carotinoidbildung auch auf die Synthese der Sterine?

Neben der Untersuchung der Frage nach dem Angriffspunkt des Lichtes sollte noch versucht werden, einer Aufklärung des bisher unbekannten Biosynthesewegs der Carotinoide bei Fusarium näherzukommen.

B. MATERIAL und METHODEN

1. Anzucht des Pilzes

Als Versuchsobjekt dieser Arbeit diente der imperfekte Pilz F u s a r i u m a q u a e d u c t u u m , der bereits in früheren Arbeiten von RAU und ZEHENDER verwendet wurde (siehe Zusammenstellung bei RAU 1967 b). Der Pilz wurde in Sub-

merskultur gezüchtet; dazu wurden Sporen aus Reinkulturen in Erlenmeyerkolben (Inhalt 1 Liter) mit 400 ml 3 %iger Biomalzlösung (pH 5,6) unter Vermeidung jeglichen Lichteinfalls eingeimpft und 2 Tage lang in völliger Dunkelheit auf einer Schüttelmaschine angezogen. Die Anzuchtdauer von 2 Tagen hatte sich als optimal erwiesen, da nach dieser Zeit das Verhältnis zwischen Stickstoffgehalt und Trockengewicht am günstigsten für eine maximale Farbstoffausbeute ist. Die Wachstumsphase ist nach dieser Zeit weitgehend abgeschlossen.

2. Versuchsansatz und Versuchsdurchführung

Für die Versuche wurde der Pilz im Dunkeln abgenutscht, durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser von der Nährlösung vollkommen gereinigt und in einem Meßzylinder mit einer bestimmten Menge dest. Wasser (der Inhalt eines Kolbens auf 200 ml Wasser) durch kräftiges Schütteln aufgeschwemmt. Von dieser Stammsuspension wurden nun jeweils 50 ml in Gaswaschflaschen einpipettiert, in denen bereits 50 ml 1/60 n KH_2PO_4-Puffer (pH 5,6) und 2 % Glukose (Endkonzentration) vorlagen.

Für die Trockengewichtsbestimmung wurden aus der Stammsuspension 10 Proben mit je 5 ml entnommen, in wägegläschen 24 Stunden bei 120°C und anschließend im Exsikkator über $CaCl_2$ getrocknet. Der Mittelwert dieser 10 Gewichtswerte ergab das Trockengewicht. Die Stickstoffbestimmung erfolgte an Parallelproben nach Kjeldal.

Die Waschflaschen mit der Pilzsuspension wurden nun hintereinandergeschaltet und unter fortwährendem Durchströmen mit Luft belichtet. Als Lichtquelle dienten drei horizontal übereinander angeordnete Leuchtstoffröhren (Osram, 65 w, Lichtfarbe 15, mit Reflektor); die Lichtintensität betrug bei gleichem Abstand konstant 16 000 Lux.

3. Extraktion der Farbstoffe

Zur Extraktion der Farbstoffe wurde zunächst jede Pilzprobe abgenutscht, mehrmals mit dest. Wasser gewaschen, und das gereinigte Myzel in eine Plastikflasche, in der 2 - 3 Lagen Glasperlen und etwa 25 ml 100 %iges Methanol vorgelegt waren, eingebracht; durch Schütteln auf einer Schüttelmaschine (10 Minuten lang) wurde das Myzel vollkommen zerschlagen. Anschließend wurde dieselbe Menge Aceton zugegeben und nochmals 10 Minuten geschüttelt. Der Farbstoffextrakt wurde nun von den Myzelresten durch Abnutschen befreit und das Myzelpulver sorgfältig mit Aceton ausgewaschen. Um eine quantitative Extraktion (vor allem des Neurosporaxanthins) zu erreichen, war es notwendig, mit einer geringen Menge Eisessig (1 ml) nochmals nachzuextrahieren.

Der nun im Methanol-Aceton-Gemisch vorliegende Farbstoff wurde im Scheidetrichter mit Hilfe einer 10 %igen Ammoniumsulfatlösung in Petroläther (Kp. 30-50°C) übergetrieben; ein Petroläther mit einem so niedrigen Siedepunkt erwies sich als Lösungsmittel deshalb als sehr günstig, weil er sich nahezu ohne Erwärmen im Rotationsverdampfer schnell verdampfen läßt, was bei der Temperaturempfindlichkeit der Carotinoide wichtig ist.

Nach mehrmaligem Auswaschen der Petrolätherphase mit Wasser wurde im Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingedampft, die Farbstoffe mit 10 ml n-Hexan (Merck) wieder aufgenommen und die Absorption in einem Spektralphotometer (Zeiß PMQ II oder Beckmann Modell B und DB) gemessen. Als Maß für die Farbstoffmenge diente die Extinktion im Absorptionsmaximum.

4. Auftrennung des Farbstoffs durch Phasenverteilung

Der auf diese Weise gewonnene Farbstoff stellt ein Gemisch aus verschiedenen Carotinoiden dar, das im folgenden als "Gesamtfarbstoff" bezeichnet werden soll; es läßt sich zunächst in zwei Hauptgruppen auftrennen: in epi- und hypophasische Komponenten. Dazu wurde im Scheidetrichter der petrolätherische "Gesamtfarbstoff" mit einer gleichen Menge von 90 %igem Methanol und ca. 5 Tropfen 1 n KOH versetzt, worauf sich zwei Phasen bildeten. Ein Teil des Farbstoffs verblieb in der oberen petrolätherischen Schicht (Epiphase), das Neurosporaxanthin (ein Carotinoid mit einer -COOH-Gruppe) löste sich in der unteren basischen Methanolschicht (Hypophase). Die Zugabe von KOH beschleunigt einmal den Trennungsvorgang (saure Farbstoffe werden dadurch angezogen), gleichzeitig aber werden etwa vorhandene Fette bis zu einem gewissen Grade verseift. Um eine quantitative Trennung zu erhalten, wurde dieser Vorgang im Abstand von 20 Minuten 3 - 4 mal wiederholt, und zwar so lange, bis das alternierende Lösungsmittel vollkommen farblos erschien.

Die Epiphase wurde nun mit dest. wasser dreimal gewaschen; etwa vorhandene Trübungen ließen sich leicht mit einer 10 %igen Ammoniumsulfatlösung auswaschen. Anschließend wurde im Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingedampft, mit 10 ml n-Hexan wieder aufgenommen und im Spektralphotometer gemessen.

Um vergleichbare Meßwerte zu erhalten, mußte der hypophasische Farbstoff ebenfalls in Petroläther bzw. in Hexan übergeführt werden. Eine direkte Überführung aus 90 %igem Methanol in Petroläther war nicht quantitativ möglich, es mußte deshalb auf Umwegen geschehen. Durch Zugabe von 10 %igem Ammoniumsulfat

und Eisessig wurde der saure Hypophasenfarbstoff zunächst in Benzol übergetrieben; erst nach Eindampfen der ebenfalls mehrmals gewaschenen Benzolphase konnte der Farbstoff mit der entsprechenden Menge Petroläther aufgenommen werden. Zur vollständigen Entfernung des Benzols wurde dieser Vorgang mehrmals wiederholt.

5. Trennung der einzelnen Farbstoffkomponenten mit Hilfe der Säulenchromatographie

Im Rahmen dieser Arbeit war vor allem die quantitative Zusammensetzung des "Gesamtfarbstoffs" von Interesse. In der Hypophase befindet sich nach früheren Untersuchungen von RAU und ZEHENDER (1959) nur eine Farbstoffkomponente, das Neurosporaxanthin, während in der Epiphase ein Farbstoffgemisch vorliegt. Dieses Gemisch mußte weiter aufgetrennt werden. Im Gegensatz zu der von BÖHME (1962) angewandten Dünnschichtchromatographie nach STAHL bewährte sich die Säulenchromatographie für die Versuche dieser Arbeit besser. Zahlreiche vergleichende Vorversuche mit den verschiedensten Adsorbentien (Kieselgel, Calziumhydroxid, Calziumcarbonat, Aluminiumoxid, Magnesiumoxid, Kieselgur) und Entwicklergemischen (Petroläther, Benzol, Aceton, Benzin) auf Dünnschichtplatten und an der Säule zeigten, daß sich die weitaus beste und verlustfreieste Auftrennung der Pigmente mit Hilfe der Säulenchromatographie erzielen läßt. Als geeignetstes Adsorbens erwies sich ein Gemisch von Calziumhydroxid (Merck) und Hyflo-Super-Cel (Roth) im Verhältnis 5 : 1; als das beste Entwicklergemisch bewährte sich dabei Petroläther mit 10 - 30 % Benzol. Im einzelnen verlief der Arbeitsgang folgendermaßen:

Eine Säule von 1,5 cm Durchmesser wurde mit dem Adsorbens unter gleichmäßigem Stopfen ca. 10 cm hoch gefüllt; durch An-

schließen einer Wasserstrahlpumpe und durch sorgfältiges langsames Stopfen wurde eine gleichmäßige Dichte bei größter Festigkeit erreicht. Dies war für ein zackenfreies Wandern der einzelnen Farbstoffzonen und für eine scharfe Trennung eine wichtige Voraussetzung. Um die auf etwa 2 - 3 ml eingeengte Farbstofflösung in einer sauberen Startlinie quantitativ auf die Säule zu bringen, wurde die Flüssigkeit unter ständigem Sog der Wasserstrahlpumpe aufgetragen; dabei drang der Farbstoff in einer schmalen Startzone in die Säule ein. Durch sorgfältiges Nachgießen von Entwicklergemisch wurde das Eindringen von Luft verhindert. Das zunächst verwendete Petroläther-Benzol-Gemisch mit der niedrigsten Benzolkonzentration (10 %) ließ vor allem die weniger stark adsorbierbaren Farbstoffe vorauswandern, während die langsam laufenden Komponenten ungetrennt an der Startlinie blieben. Damit war die Möglichkeit gegeben, die schnell wandernden Farbstoffe in genügendem Abstand voneinander getrennt aufzufangen. Kurz vor dem Austreten der Lösungsmittelfront aus der Säule wurde der Sog der Wasserstrahlpumpe durch den Druck eines von oben eingeführten Stickstoffstromes ersetzt; auf diese Weise wurde ein Verdunsten des Lösungsmittels verhindert. Nach Zugabe eines Entwicklergemisches mit steigender Benzolkonzentration (bis 30 %) begannen sich die bisher festsitzenden Komponenten ebenfalls aufzutrennen, während sich gleichzeitig die vorauslaufenden Zonen noch weiter voneinander entfernten. Erst die Verwendung eines variierenden Entwicklergemisches ermöglichte eine stufenweise quantitative Trennung aller Komponenten in einem Arbeitsgang. Das Ergebnis ist in Abb.1 schematisch dargestellt.

Das Auffangen der einzelnen Fraktionen nach Durchlaufen der Säule dauerte bis zu 80 Minuten; die Verlustquote insbesonders der langsam wandernden Farbstoffe war dadurch besonders hoch (ca. 35 %). Eine entscheidende Verbesserung der Methode ergab das vorzeitige Herausdrücken der entwickelten Säule,

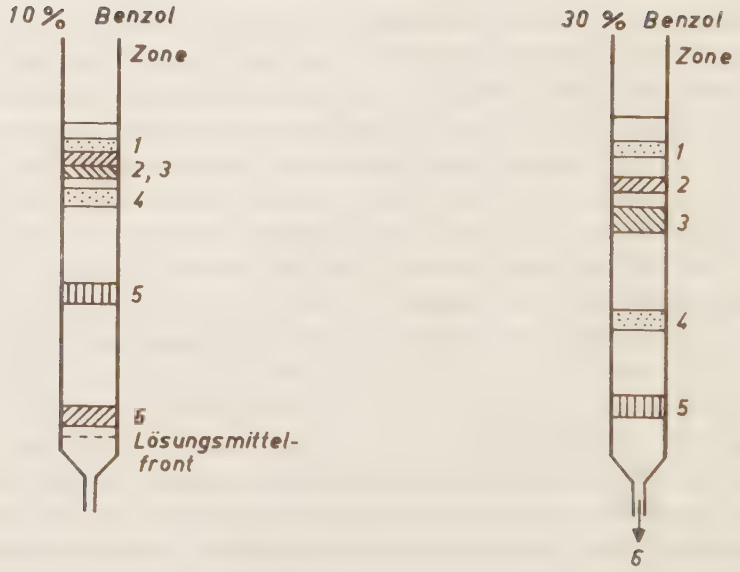


Abb.1: Verteilung der epiphasischen Carotinoide auf einer Calziumhydroxid - Hyflo-Super-Cel - Säule mit verschiedenen Entwicklergemischen.

nachdem die Zonen 6 und 5 getrennt aufgefangen worden waren. Dadurch konnte die Zeitdauer eines Chromatogramms auf etwa 20 Minuten herabgesetzt werden; gleichzeitig verringerte sich der durchschnittliche Farbstoffverlust auf 5 %, da nur die Zeit des Entwickelns, nicht aber die Zeit des Durchlaufs bis zur letzten Fraktion abgewartet werden mußte.

Nach dem Herausdrücken der gesamten Säule, die dabei kompakt blieb, konnten die einzelnen Zonen sauber auseinandergeschnitten und zum Eluieren in kleine Erlenmeyerkölbchen übergeführt werden, die als Eluiermittel Aceton und etwas Methanol enthielten. Nach kräftigem Schütteln wurden die einzelnen Pro-

ben mit einer Glasfilternutsche G 4 abgefrittet, der farblose Rückstand mehrmals mit Aceton nachgewaschen und die klaren Farbstofflösungen im Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde der Farbstoff mit 5 ml n-Hexan wieder aufgenommen und die Absorption im Spektralphotometer gemessen. Die Extinktion im mittleren Absorptionsmaximum ermöglichte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $E_{1cm}^{1\%}$ die Berechnung der Farbstoffmenge in µg.

6. Versuche zur Abtrennung der Sterine

Bei der eben beschriebenen Methode traten beim Chromatographieren und vor allem beim Identifizieren mancher Farbstoffkomponenten Schwierigkeiten auf. Der Pilz bildet bei der reichlichen Glukosefütterung (2 %) in der bis zu 96 Stunden dauernden Versuchszeit Fette und große Sterinmengen. Diese Stoffe werden mitextrahiert und gelangen bei der Epi-Hypophasentrennung in die Epiphase, wo sie in Petroläther gelöst bleiben. Sie erwiesen sich beim Chromatographieren und beim Identifizieren der gesättigten Carotinoide als sehr störend; vor allem wanderte das Ergosterin mit der Farbstoffzone 6, so daß beide nur zusammen eluiert werden konnten.

Trotz zahlreicher Versuche konnte kein Adsorbens gefunden werden, mit dessen Hilfe sich die Sterine quantitativ von den Carotinoiden abtrennen lassen. Da Ergosterin im Pilzmyzel gegenüber den Carotinoiden in etwa 25 - 50facher Menge vorhanden war, mußte ein Weg gesucht werden, diesen für die Identifizierung und quantitative Bestimmung der Pigmente störenden Begleitstoff zu entfernen, zumal die Absorptionsmaxima der gesättigten Carotinoide und des Ergosterins im gleichen Wellenbereich liegen.

a) Ausfällen von Ergosterin mit Digitonin

Digitonin ist ein spezifisches Fällungsmittel für Ergosterin (DAVIES 1965). Es wurde in 90 %igem Äthanol zu etwa 0,1 % gelöst und von dieser Lösung einige Tropfen der petrolätherischen Farbstofflösung unter ständigem Rühren und leichtem Erwärmen zugegeben; nach einigen Minuten begann ein Niederschlag auszufallen, der nach 60 Minuten abgenutscht und mit Petroläther ausgewaschen werden konnte. Eine mehrmalige Wiederholung dieser Prozedur führte zwar zu einer nahezu vollständigen Abtrennung der Sterine, gleichzeitig ging aber auch ein relativ großer Prozentsatz der Carotinoide verloren.

b) Ausfrieren der Sterine

Als wohl einfachste und verlustfreieste Methode zur Entfernung der störenden Begleitstoffe hat sich das Ausfrieren erwiesen. Stellt man eine etwas konzentriertere Farbstofflösung in die Tiefkühltruhe (- 25°C), so zeigt sich nach einigen Stunden ein flockiger Niederschlag, der sich jedoch bei Erwärmung sofort wieder löst. Bei dieser tiefen Temperatur wird das Löslichkeitsprodukt der in Petroläther mitgelösten Fette und Sterine so stark herabgesetzt, daß weitaus der größte Teil davon ausflockt. Kühlt man die Lösung in schmalen Reagenzgläschen ab, so setzt sich der Niederschlag am Boden ab; nach Abzentrifugieren bei dieser tiefen Temperatur läßt sich die klare Farbstofflösung mühelos dekantieren. Da im Niederschlag aber immer geringe Farbstoffreste vorhanden waren, wurde er in Petroläther bei Zimmertemperatur gelöst, seine Absorption gemessen und bei der Berechnung der Carotinoidmenge berücksichtigt.

Eine vollständige Entfernung der Sterine konnte auch mit dieser Methode nicht erreicht werden; der verbleibende geringe Rest störte aber die chromatographische Trennung nicht mehr wesentlich. Allerdings mußte auf eine Bestimmung der Carotinoidvorstufen Phytoen und Phytofluen, deren Absorptionsmaxima denen des Ergosterins benachbart sind (Phytoen 275, 286, 297 nm; Phytofluen 331, 348, 368 nm; Ergosterin 272, 282, 295 nm), verzichtet werden.

Die Methode des Ausfrierens der Sterine wurde bei allen Versuchen dieser Arbeit angewendet.

C. VERSUCHE und ERGEBNISSE

1. Identifizierung der einzelnen Farbstoffkomponenten

Die Zusammensetzung des Pigments von Fusarium aquaeductuum wurde bereits 1959 von RAU und ZEHENDER untersucht; inzwischen konnten aber sowohl die mengenmäßigen Farbstoffausbeuten gesteigert als auch die Trennungsmethoden verbessert werden, so daß es möglich war, verschiedene bisher nicht identifizierbare Komponenten in genügender Menge rein zu isolieren. Es erschien deshalb notwendig, die Identität der einzelnen Komponenten zu überprüfen bzw. neu zu bestimmen.

Zur Reindarstellung wurden die epiphasischen Farbstoffe an Calziumhydroxidsäulen getrennt, mit Aceton-Petroläthergemischen bzw. mit Benzol-Petroläthergemischen eluiert und die einzelnen Fraktionen nochmals rechromatographiert. Die hypophasischen Carotinoide ließen sich auf Grund ihres star-

ken Adsorptionsverhaltens nur auf Zellulosesäulen chromatographieren.

Zur Identifizierung der einzelnen Komponenten wurden ihre Absorptionsspektren z.T. auch nach Jod-Isomerisierung in verschiedenen Lösungsmitteln (n-Hexan, Petroläther, Schwefelkohlenstoff, Benzol, Methanol) aufgenommen; schon ein Vergleich mit entsprechenden Literaturwerten erlaubte eine vorläufige Bestimmung. Zur endgültigen Identifizierung wurden aus anderen Organismen bereits sicher bekannte Pigmente isoliert und mit den entsprechenden Komponenten von Fusarium hinsichtlich der Absorptionsspektren und des chromatographischen Verhaltens verglichen. Neurosporaxanthin, Neurosporin, ζ-Carotin und ϒ-Carotin wurden aus Neurospora (JENSEN 1965), Lycopin aus Tomatenparenchym und trans-Torulin aus Rhodotorula gewonnen.

Der Farbstoff der Zone 3 unseres Chromatogramms (siehe Abb.1) besitzt Absorptionseigenschaften, die mit keinem bekannten trans-Carotinoid identisch sind; das Vorhandensein eines cis-Gipfels ließ vermuten, daß es sich um ein cis-Isomeres handelt. Nach Jod-Isomerisierung konnte der Farbstoff chromatographisch in zwei Komponenten aufgetrennt werden, von denen die eine die gleichen Absorptionsmaxima wie der Ausgangsfarbstoff hatte, während die andere nach dem Absorptionsspektrum und dem chromatographischen Verhalten mit trans-Torulin identisch war. Andererseits ließ sich aus trans-Torulin nach Jod-Isomerisierung chromatographisch ein Pigment isolieren, dessen Absorptionsspektrum mit dem der Zone 3 identisch war. Es kann deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß es sich bei dem Carotinoid der Zone 3 um cis-Torulin handelt.

Ob cis-Torulin bereits in vivo vorhanden ist oder erst durch den Aufarbeitungsprozeß entsteht, kann nicht entschieden werden. Die ermittelten Mengen von cis- und trans-Torulin wurden

deshalb in allen Fällen addiert und in sämtlichen Darstellungen dieser Arbeit gemeinsam als Torulin wiedergegeben. Da aus der Literatur kein Extinktionskoeffizient für cis-Torulin bekannt ist, mußte ein ungefährer $E^{1\%}_{1cm}$-Wert aus dem von trans-Torulin errechnet werden. Als Vergleichsgrößen dienten dabei die Extinktionskoeffizienten von cis- und trans-Lycopin, das chemisch sehr ähnlich gebaut ist und das den gleichen Maximumsabstand zwischen cis- und trans-Verbindung aufweist wie das Torulin (Tab.1).

	Torulin		Lycopin	
	trans	cis	trans	Neo
Absorpt.max.	486/87	476/78	472	462/63
Abs.koeff.	2 680	2 040	18,6	14,1
	($E^{1\%}_{1cm}$)		($E^{mol}_{1cm}\ 10^{-4}$)	

Tab.1: Vergleich der Absorptionsmaxima und der Extinktionskoeffizienten von Torulin und Lycopin zur Berechnung des $E^{1\%}_{1cm}$-Wertes von cis-Torulin.

Die Ergebnisse der Versuche zur Identifizierung der Carotinoide von Fusarium aquaeductuum sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Farbstoffzone und Herkunft	Absorptionsmaxima Hexan	Benzol	$E^{1\%}_{1cm}$(Hexan)	Identifiziert als
Hypophase				
Fusarium:	- ; 478; 508	- ; 492; - ;	1 715	Neurospora-xanthin
Neurospora:	- ; 480; 508	- ; 494; - ;	(AASEN u. JENSEN 1965)	
Literatur (Petroläther):	- ; 477; 505 (AASEN u. JENSEN 1965)			
Epiphase				
Zone 1			3 450	Lycopin
Fusarium:	448; 473; 504	459; 487; 518	(DAVIES 1965)	
Tomatenparenchym:	445; 472; 502	459; 486; 519		
Literatur:	446; 474; 506 (GOODWIN 1955)			
Zone 2			2 680	trans-Torulin
Fusarium:	458; 487; 519	- ; 502; 534	(SIMPSON, NAKAYAMA u. CHICHESTER 1964)	
Rhodotorula:	456; 486; 519	- ; 502; 536		
Literatur: (Petroläther)	455; 486; 520 (BONNER, SANDOVAL, TANG u. ZECHMEISTER 1946)			
Zone 3			2 040	cis-Torulin
Fusarium:	455; 477; 509	465; 495; 526	(berechnet nach Tab.1)	
nach Isomerisierung cis:	455; 477; 509	465; 495; 526		
trans:	458; 485; 518	473; 500; 533		
Zone 4			2 740	Neurosporin
Fusarium:	416; 439; 468	425; 452; 483	(NAKAYAMA 1958)	
Neurospora:	416; 440; 468	428; 452; 481		
Literatur:	416; 440; 470 (ISLER u. SCHUDEL 1963)			
Zone 5			2 760	γ-Carotin
Fusarium:	437; 462; 492;	448; 475; 508	(GOODWIN 1956)	
Neurospora:	436; 461; 490	448; 477; 507		
Literatur:	437; 462; 494 (ISLER u. SCHUDEL 1963)	447; 477; 508		
Zone 6			2 500	ζ-Carotin
Fusarium:	374; 398; 423		(NASH, QUACKENBUSH u. PORTER 1948)	
Neurospora:	376; 397; 422			
Literatur:	378; 400; 425 (GOODWIN 1955)			
Sterine	272; 282; 294 (Petroläther)		308 (KAKUTANI 1967)	Ergosterin

Tabelle 2: Absorptionsmaxima, Extinktionskoeffizient und Identifizierung der bei Fusarium aquaeductuum gefundenen Carotinoide im Vergleich mit Pigmenten aus anderen Organismen und mit Werten aus der Literatur.

2. Carotinoidsynthese im Dunkeln

Zur Klärung der Frage, ob die Carotinoidsynthese bei Fusarium ohne Lichtinduktion nur bis zu einem bestimmten Punkt in der Biosynthesekette verläuft (siehe Einleitung), wurde untersucht, aus welchen Komponenten sich der im Dunkeln gebildete Farbstoff zusammensetzt.

Versuche von RAU (1967 a) hatten ergeben, daß Fusarium bereits am Ende der Wachstumsphase Carotinoide enthält und bei Zusatz von Glukose in der Lage ist, über längere Zeit hinweg auch ohne Lichtinduktion geringe Mengen von Pigmenten zu bilden. Es stellte sich heraus, daß die im Dunkeln pro Zeiteinheit gebildete "Gesamtfarbstoff"-Menge während einer Versuchsdauer von 72 Stunden gleich bleibt.

Bei der Betrachtung der Absorptionsmaxima dieses "Gesamtfarbstoffes" zeigte sich mit zunehmender Dauer des Versuchs eine Verschiebung zum längerwelligen Bereich. Wenn auch die Maximumsänderung nicht sehr ausgeprägt war, so ließ sich dennoch eine Änderung der Pigmentzusammensetzung erwarten.

Zunächst mußte geprüft werden, in welchem Umfang Carotinoide bereits unmittelbar nach Abschluß der Wachstumsphase vorhanden sind. Die dabei ermittelten Werte sollten gleichzeitig als "Startwerte" für die späteren Versuche dienen. Um zu vermeiden, daß eine bestimmte Farbstoffmenge bereits durch das Animpfmaterial in die Anzuchtkultur übernommen wird, wurden die zum Animpfen benutzten Stammkulturen in ständiger Dunkelheit gezüchtet und aufbewahrt.

Zur quantitativen Bestimmung der einzelnen Farbstoffkomponenten unmittelbar nach Abschluß der Wachstumsphase wurden von der Stammsuspension je 400 ml für eine Probe entnommen. Die

Farbstoffe wurden in der bereits beschriebenen Weise extrahiert und nach Auftrennung in die einzelnen Komponenten die Extinktion gemessen. Da die Pilze nur sehr geringe Farbstoffmengen enthielten, mußten verhältnismäßig große Mengen der Pilzsuspension für eine Probe verwendet werden (400 ml dieser Suspension entsprechen durchschnittlich 3 g Trockengewicht).

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung sind in Tab.3 zusammengestellt. Die Werte zeigen, daß nach Abschluß der Wachstumsphase bereits sämtliche Komponenten vorhanden sind. Der prozentuale Anteil der gesättigteren Carotinoide ist aber größer als bei der Farbstoffsynthese nach Lichtinduktion.

	Pigmentmenge nach Abschluß der Wachstumsphase		Pigmentmenge nach Lichtinduktion	
	µg/g Tr.gew.	%	µg/g Tr.gew.	%
ζ-Carotin	1,4	17,3	4,0	1,8
Neurosporin	0,5	6,2	2,6	1,2
γ-Carotin	2,2	27,1	20,1	9,4
Torulin	0,9	11,2	26,5	12,4
Lycopin	0,7	8,6	20,3	9,5
Neurosporaxanthin	2,4	29,6	140,0	65,7

Tab.3: Menge der einzelnen Carotinoide im Pilzmyzel nach Abschluß der Wachstumsphase und nach Lichtinduktion.

Zur Untersuchung der Carotinoidsynthese im Dunkeln wurden wie bereits beschrieben je 50 ml Pilzsuspension in Gaswaschflaschen gefüllt. Nach 24, 48, 72 Stunden wurden Proben entnom-

men, und die Menge der einzelnen Carotinoide bestimmt.

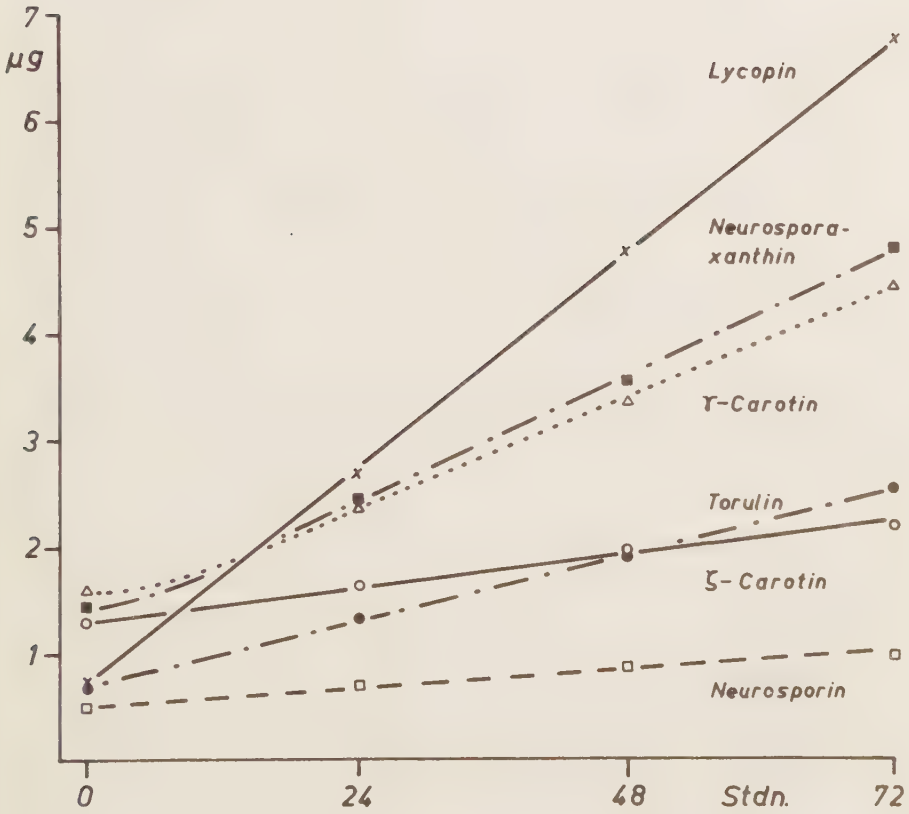


Abb.2: Bildung der einzelnen Carotinoide im Dunkeln. Abszisse: Versuchszeit in Stunden. Ordinate: Farbstoffmenge in µg pro g Trockengewicht. Mittelwerte aus 6 Versuchen.

Entsprechend den Ergebnissen von RAU (1967 a) blieb auch in den vorliegenden Versuchen die pro Zeiteinheit gebildete Farbstoffmenge während der gesamten Reaktionsdauer konstant; die Farbstoffproduktion verläuft also im Dunkeln linear mit der Zeit. Dies gilt nicht nur für die Zunahme der "Gesamtfarbstoff"-Menge, sondern auch, wie die in Abb.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, für jedes einzelne Carotinoid. Der Anstieg setzt bei fast allen Farbstoffen sofort nach Versuchsbeginn ein, lediglich bei γ-Carotin und bei Neurosporaxanthin ist eine unwesentliche Verzögerung zu erkennen.

Wie der verschieden steile Anstieg der Kurven zeigt, nimmt die Farbstoffmenge nicht bei allen Komponenten im gleichen Maße zu. So werden innerhalb von 24 Stunden z.B. vom Lycopin 2 µg, von Neurosporin dagegen nur etwa 0,1 µg gebildet. Die Zusammensetzung des "Gesamtfarbstoffes" ändert sich also mit der Zeit, was die beobachtete Verschiebung des Absorptionsmaximums verständlich macht.

Aus den bisherigen Versuchen über die Carotinoidsynthese ohne Lichtinduktion können zusammenfassend folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die Farbstoffbildung bleibt nicht an einer bestimmten Stelle der Synthesereihe stehen.
2. Die Syntheserate bleibt für jede der Komponenten während der gesamten Versuchsdauer konstant.
3. Keines der gesättigteren Pigmente häuft sich an.

3. Verlauf der Carotinoidsynthese nach Lichtinduktion

Die Pilzsuspension wurde wie bereits beschrieben in Gaswaschflaschen gefüllt und unter ständiger Durchlüftung belichtet.

Verschiedene Zeiten nach Beginn der Belichtung wurden Proben entnommen und die Menge der einzelnen Carotinoide im Pilzmyzel bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb.3 dargestellt. Die eingezeichneten Daten sind Mittelwerte aus 7 Versuchen.

Wie aus den Kurven zu ersehen ist bleibt die Menge der einzelnen Carotinoide bis zu 60 Minuten nahezu unverändert, d.h. innerhalb dieses Zeitraumes nach Belichtungsbeginn werden fast keine Farbstoffe synthetisiert; lediglich ζ-und γ-Carotin nehmen geringfügig zu. Erst nach 60 Minuten beginnt die Synthese der einzelnen Komponenten deutlich anzusteigen und zwar nach verschieden langen Zeiten. Die zeitliche Folge dieses Anstiegs kann durch eine andere Darstellungsweise deutlicher gezeigt werden: Dazu wurden die Werte aus Abb.3 um den "Startwert" (Farbstoffmenge unmittelbar nach Abschluß der Wachstumsphase, also vor Beginn der Belichtung) vermindert; die unterschiedlichen Ausgangsmengen, welche die Deutlichkeit der zeitlichen Folge beeinträchtigen, werden damit eliminiert. Die Zunahme der Farbstoffmenge wurde dann in % des Wertes errechnet, den die einzelnen Komponenten nach Beendigung der Farbstoffsynthese (72 Stunden nach Beginn der Belichtung; Belichtungszeit 2 Stunden) erreichen. Durch diese Berechnung wird allein die durch die Belichtung ausgelöste Zunahme der einzelnen Carotinoide dargestellt. Die Werte sind in Abb.4 zusammengefaßt.

Was bei der Darstellung der absoluten Farbstoffmengen in Abb.3 nur schlecht zu erkennen ist, kommt in Abb.4 deutlich zum Ausdruck: die zeitliche Reihenfolge des Anstiegs der einzelnen Komponenten in Abhängigkeit vom jeweiligen Sättigungscharakter. So nimmt z.B. in den ersten 60 Minuten nach Belichtungsbeginn die Torulin-, Lycopin- und Neurosporaxanthinmenge nicht zu, während bei γ-Carotin und vor allem bei

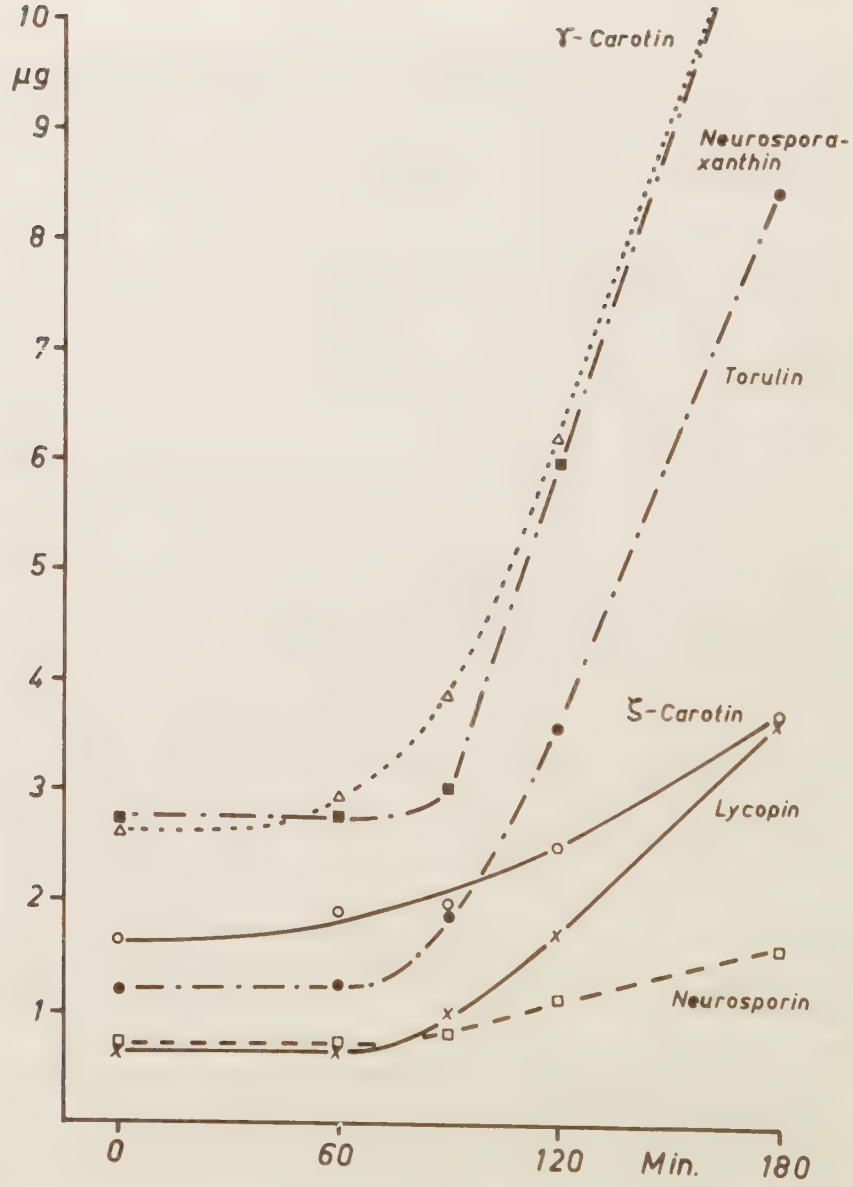


Abb.3: Verlauf der Farbstoffbildung im Licht. Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung. Ordinate: Farbstoffmenge in µg pro g Trockengewicht. Mittelwerte aus 7 Versuchen.

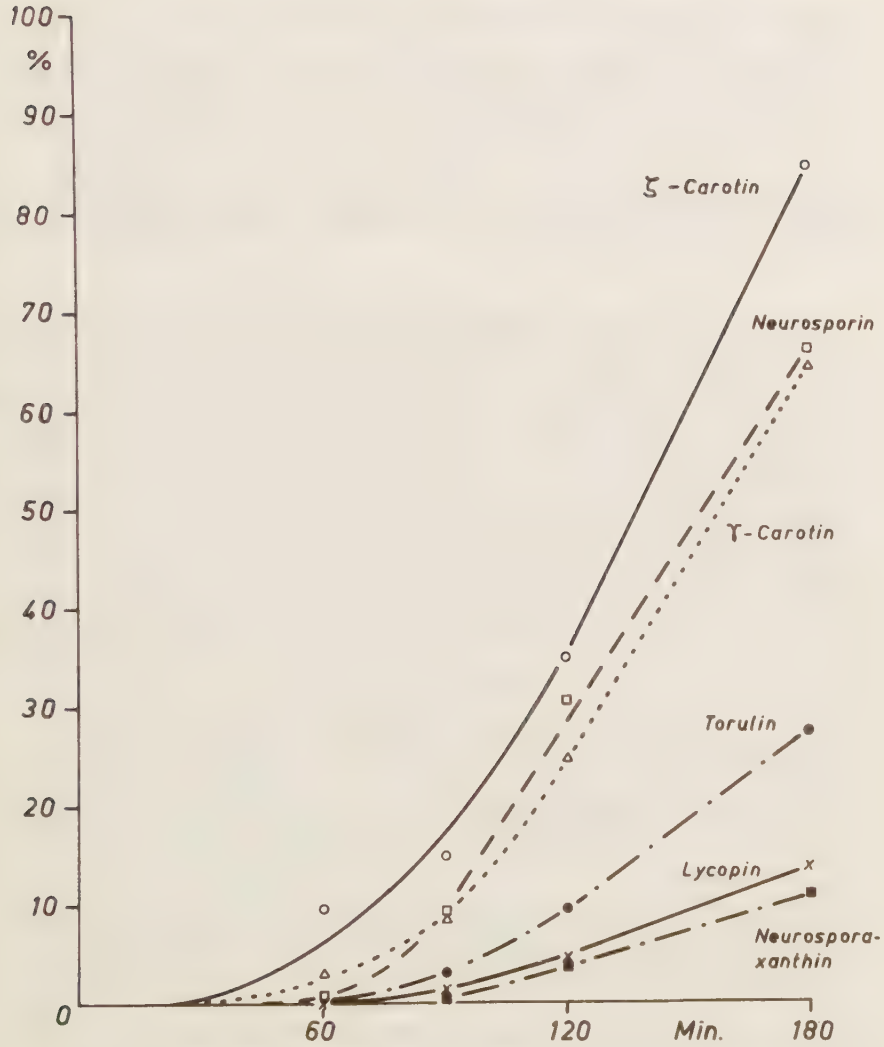


Abb.4: Verlauf der Farbstoffbildung im Licht in relativen Einheiten. Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung. Ordinate: Zunahme der Farbstoffmenge über den "Startwert" in % der Farbst.menge nach Beendigung der Carotinoidsynthese. Mittelwerte aus 7 Versuchen.

ζ-Carotin ein deutlicher Anstieg zu erkennen ist.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei Fusarium die Synthese der einzelnen Carotinoide nicht gleichzeitig beginnt. Eine voneinander unabhängige, parallel verlaufende Bildung aus einer gemeinsamen Vorstufe, wie sie von GOODWIN (1951), MACKINNEY (1952), ZALOKAR (1954) und QUACKENBUSH (1960) angenommen wird, ist deshalb unwahrscheinlich.

Bei Fusarium beginnt die Farbstoffproduktion mit der Bildung der gesättigteren Carotinoide; erst danach nehmen schrittweise auch die ungesättigten Komponenten zu. Eine Sonderstellung nimmt dabei das Neurosporin ein; seinem chemischen Bau entsprechend steht es in der PORTER-LINCOLN-Reihe vor dem γ-Carotin und müßte deshalb in unserem Versuch mindestens gleichzeitig mit diesem ansteigen. Die absoluten Mengen an Neurosporin sind aber so gering und der Fehler bei den Bestimmungen deshalb so groß, daß über kleine Änderungen der Menge nichts sicheres ausgesagt werden kann. Auf Grund der zeitlichen Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten könnte man für die Carotinoidsynthese bei Fusarium folgende Sequenz annehmen:

$$\zeta\text{-Carotin} \longrightarrow \left(\begin{matrix}\text{Neurosporin}\\ \gamma\text{-Carotin}\end{matrix}\right) \longrightarrow \text{Torulin} \longrightarrow \left(\begin{matrix}\text{Lycopin}\\ \text{Neurosporax.}\end{matrix}\right)$$

Diese Aufstellung steht im Einklang mit der von PORTER und LINCOLN geforderten Reihenfolge.

Allerdings müßte nach dem PORTER-LINCOLN-Schema γ-Carotin durch Ringschluß aus Lycopin entstehen. Wie jedoch Abb.4 deutlich zeigt, steht Lycopin in der zeitlichen Folge nach dem γ-Carotin. In Anlehnung an die Ansicht von PORTER ist

hier entweder ein gegenläufiger Vorgang anzunehmen oder aber das Lycopin nimmt innerhalb des Biosynthesewegs der Carotinoide bei Fusarium eine Sonderstellung ein.

4. Die Wirkung von Diphenylamin auf die Bildung der einzelnen Carotinoide

Diphenylamin (DPA) hemmt die Bildung der ungesättigteren Carotinoide. Auf Grund quantitativer Untersuchungen haben GOODWIN (1951, 1952, 1953) und FRIEND et al.(1955) bei Phycomyces, TURIAN und HAXO (1952) bei Mycobacterium und TURIAN (1957) bei Allomyces und Neurospora gefunden, daß unter Einwirkung von DPA die Synthese der gesättigteren Carotinoide ungehindert abläuft, während die Bildung der ungesättigteren Pigmente nahezu vollständig unterdrückt wird. Bei den genannten Mikroorganismen werden Phytoen, Phytofluen, ζ-Carotin und Neurosporin angehäuft, Lycopin und ß-Carotin sind dagegen nur noch in Spuren zu finden.

In Anlehnung an das PORTER-LINCOLN-Schema lassen diese Beobachtungen den Schluß zu, daß sich die gesättigteren Polyene nur deshalb anhäufen, weil deren Umwandlung in Lycopin und ß-Carotin behindert ist. TURIAN (1957) nimmt an, daß DPA auf Grund seiner reduzierenden Eigenschaften die Dehydrierung der gesättigteren Carotinoide hemmt. Nach RILLING (1965) können die gesättigteren Komponenten infolge Blockierung der entsprechenden Dehydrogenasen durch DPA nicht mehr dehydriert werden.

Diese spezifische Eigenschaft, durch Unterbrechung der Farbstoffsynthese an einer bestimmten Stelle die gesättigteren Komponenten anzustauen, könnte vielleicht einen weiteren Anhaltspunkt für die Aufklärung der lichtabhängigen Reaktion

in der Biosynthesekette liefern. Nimmt man z.B. an, daß durch Licht die Anlieferung von Carotinoidvorstufen erhöht wird, dann müßten sich nach einer Belichtung unter der Einwirkung von DPA diejenigen Carotinoide anhäufen, die in der Biosynthesekette vor dem Ansatzpunkt des DPA liegen. Greifen die durch Belichtung in Gang gesetzten Vorgänge jedoch erst bei der Dehydrierung der gesättigteren Carotinoide, also an etwa der gleichen Stelle wie DPA ein, was z.B. von GROB angenommen wird, dann ist kein solcher Anstau unter DPA-Einwirkung zu erwarten.

Es sollte deshalb mit Hilfe von DPA untersucht werden, inwieweit bei Fusarium sowohl nach Belichtung als auch im Dunkeln ein Anstau der gesättigteren Carotinoide auftritt.

Bei der Verwendung von DPA mußte zunächst geprüft werden, ob es nicht als Gift den Stoffwechsel des Organismus allgemein schädigt, wie stark sich eine eventuelle Schädigung auswirkt und bis zu welcher Konzentration der Pilz überhaupt in der Lage ist, seinen Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Es wurde deshalb die Atmung (gemessen als O_2-Aufnahme) des Pilzmyzels bei verschiedenen DPA-Konzentrationen (10^{-6} bis 10^{-4} molar) über längere Zeit (48 Stunden) im Warburgapparat gemessen. Dabei zeigte sich, daß DPA-Konzentrationen bis zu 10^{-4}molar die Atmungstätigkeit in keiner Weise beeinträchtigen.

Um nun die optimale Konzentration für die Hemmung der Carotinoidsynthese zu finden, wurden Versuche mit verschiedenen DPA-Konzentrationen (10^{-6} bis 10^{-4} molar) in folgender Weise angesetzt:
Von der Pilzsuspension wurden je 50 ml zusammen mit 50 ml Phosphatpuffer und 2 % Glukose in Gaswaschflaschen einpipettiert und mit der entsprechenden DPA-Menge versetzt. Die Proben wurden anschließend unter ständiger Luftzufuhr 2 Stunden lang belichtet und weitere 24 Stunden zur Nachreaktion in die Dunkelkammer gestellt; nach RAU (1967 a) ist nach dieser Zeit

die lichtinduzierte Carotinoidsynthese nahezu ausgeschlossen. Außerdem wurden jeweils belichtete und unbelichtete Kontrollproben mitgeführt, die den Versuchsproben genau entsprechenden Bedingungen ausgesetzt waren. Die Ergebnisse über die Farbstoffbildung bei verschiedenen DPA-Konzentrationen sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

	Extinktion des "Gesamtfarbstoffes" x 10^3						
	Dunkel	Belichtet					
DPA-Konz. (nm)	0	0	10^{-6} mol.	$3{,}3\times10^{-6}$ mol.	10^{-5} mol.	$3{,}3\times10^{-5}$ mol.	10^{-4} mol.
460							30,6
465	158				338	118	31,1
468	160			511	339	120,5	30,5
470	158			514	336	118	
472		332	522	510			
475		540	527				
478		533	521				

Tab.4: Farbstoffbildung bei verschiedenen DPA-Konzentrationen (Extinktion pro 0,1 g Trockengewicht).
2 Std. Belichtung; 24 Std. Nachreaktion im Dunkeln

Die Werte zeigen, daß bis zu einer Konzentration von $3{,}3\times10^{-6}$ molar praktisch keine Hemmung der Farbstoffproduktion eintritt; bei $3{,}3\times10^{-5}$ molar werden nur die Werte der Dunkelkontrollen erreicht, höhere Konzentrationen scheinen vollständig zu hemmen. Außerdem läßt sich mit einer Erhöhung der DPA-Konzentra-

tion eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes in den kürzerwelligen Bereich erkennen; in Abhängigkeit von der Giftkonzentration ändert sich offensichtlich auch die Zusammensetzung des Pigments.

Zur Ermittlung des Anstaueffektes wurde nun der bei verschiedenen Giftkonzentrationen gebildete "Gesamtfarbstoff" in die einzelnen Komponenten aufgetrennt. Bereits aus der Lage des Absorptionsmaximums konnte man vermuten, daß sich ein Anstau der gesättigteren Komponenten im Bereich der Konzentrationen $3{,}3 \times 10^{-5}$ bis 10^{-5} molar zeigen würde. Einen Vergleich der Anteile sämtlicher Farbstoffkomponenten am "Gesamtfarbstoff" bei verschiedenen DPA-Konzentrationen zeigt Abb.5.

Bei der Konzentration 10^{-4}molar bleiben die gebildeten Farbstoffmengen bei allen Komponenten unter den Werten der Dunkelproben; die ungesättigteren Pigmente (Neurosporaxanthin, Lycopin, Torulin) werden aber deutlich stärker gehemmt als die gesättigteren.

Bei der Konzentration $3{,}3 \times 10^{-5}$m ist eine starke Zunahme von ζ-Carotin und Neurosporin zu erkennen; die Menge dieser Pigmente übertrifft die entsprechenden Anteile der Kontrollproben ohne DPA um nahezu 50 %, während die Bildung von γ-Carotin, besonders aber die von Torulin, Lycopin und Neurosporaxanthin unterdrückt ist. Demnach tritt auch bei Fusarium der von anderen Organismen beschriebene DPA-Effekt auf: die mehr gesättigten Komponenten wie ζ-Carotin und Neurosporin werden angehäuft, die Bildung der ungesättigteren Polyene wird unterdrückt. Dieser Anstau erstreckt sich wahrscheinlich auch auf die nicht mehr erfaßten farblosen Komponenten Phytoen und Phytofluen, da zumindest Phytofluen, welches Fusarium unter Normalbedingungen in kaum meßbaren Mengen bildet, durch eine deutliche Gipfelbildung bei 348 und 368 nm festgestellt werden konnte.

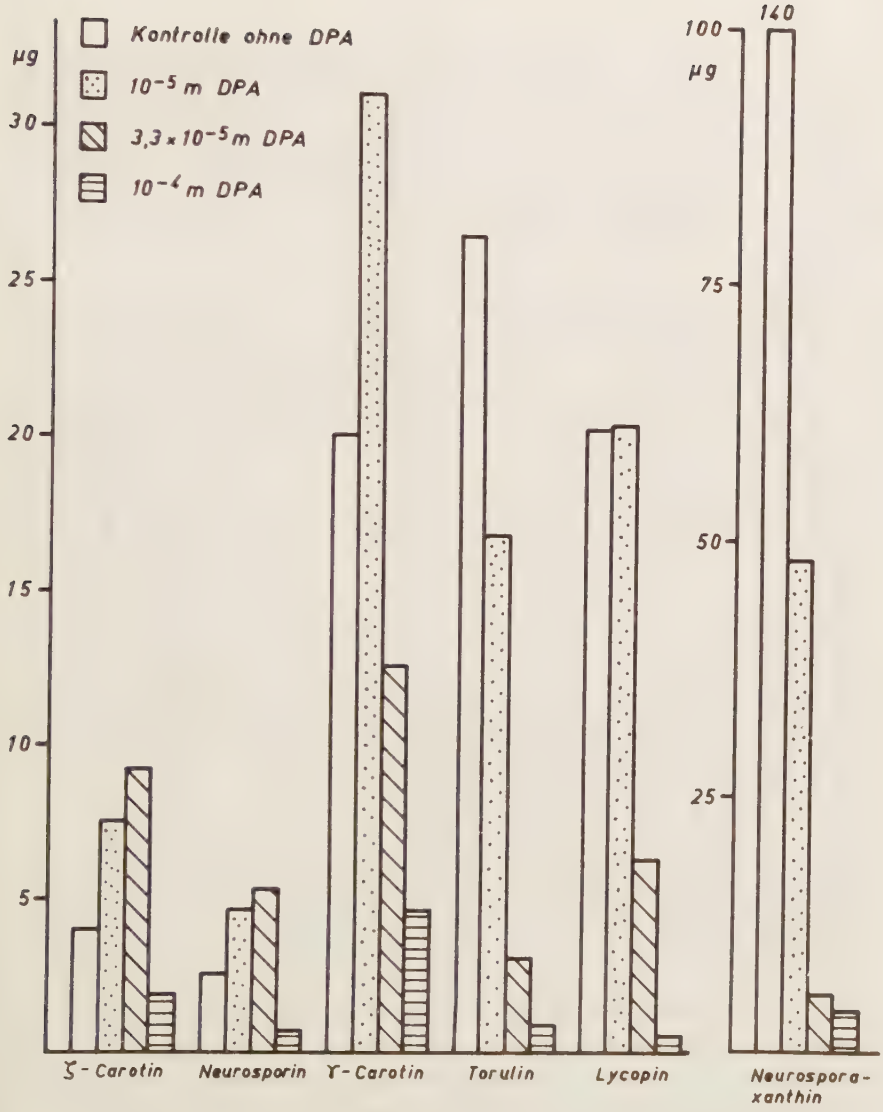


Abb.5: Wirkung von Diphenylamin auf die durch Licht induzierte Carotinoidsynthese. Die Farbstoffmenge ist in µg pro g Trockengewicht angegeben. Mittelwerte aus 5 Versuchen.

Auch bei der Konzentration 10^{-5}molar zeigt sich ein gewisser Anstaueffekt. Die Synthese verläuft aber hier offenbar ungehindert bis zum γ-Carotin, so daß auch diese Komponente angehäuft wird. Die Bildung der übrigen Pigmente wird allerdings, mit Ausnahme von Neurosporaxanthin, kaum noch unterdrückt.

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, daß bei Belichtung in Gegenwart von DPA die gesättigteren Komponenten angehäuft werden. Eine Zunahme von ζ-Carotin, Neurosporin und γ-Carotin in einem solchen Ausmaß (durchschnittlich 50 %ige Erhöhung über die entsprechenden Kontrollwerte) wird nur dann verständlich, wenn man annimmt, daß ihre Synthese durch Licht gesteigert, sie selbst aber infolge Inaktivierung der dehydrierenden Enzyme (RILLING 1965) nicht weiterverarbeitet werden können.

Darüber hinaus kann aber aus den Versuchsdaten noch geschlossen werden, daß die Blockierung der Carotinoidsynthese durch DPA nicht an einer bestimmten Stelle lokalisiert ist, sondern sich mit zunehmender Konzentration verschiebt; bei 10^{-5}m werden ζ-Carotin, Neurosporin und γ-Carotin, bei $5{,}5\times10^{-5}$m nur ζ-Carotin und Neurosporin angestaut.

Inwieweit die Anhäufung der gesättigteren Komponenten von der Lichteinwirkung abhängig ist, zeigt ein Vergleich der DPA-Wirkung auf die Farbstoffbildung im Dunkeln und nach Belichtung. Wie aus den in Abb.6 dargestellten Werten hervorgeht, wird im Dunkeln die Synthese aller Komponenten gehemmt. Im Gegensatz zur Farbstoffbildung nach Lichtinduktion kommt es bei keiner Konzentration zu einem Anstau der gesättigteren Carotinoide. In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Versuche im Dunkeln und mit Licht nocheinmal vergleichend gegenübergestellt.

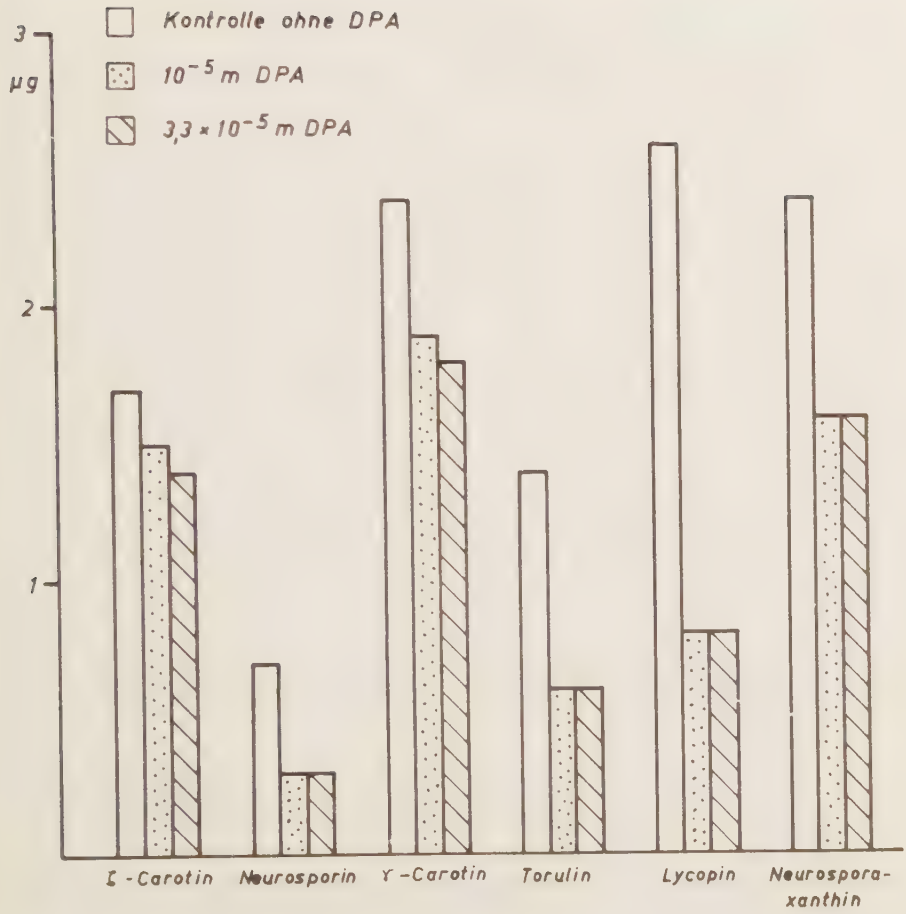


Abb.6: Wirkung von Diphenylamin auf die Carotinoidsynthese im Dunkeln. Die Farbstoffmenge ist in µg pro g Trokkengewicht angegeben. Mittelwerte aus 8 Versuchen.

	Farbstoffmenge in ug/g Tr.gew.					
	Belichtet			Dunkel		
DPA-Konzentr.:	0	10^{-5} mol.	$3{,}3 \times 10^{-5}$ mol.	0	10^{-5} mol.	$3{,}3 \times 10^{-5}$ mol.
ζ-Carotin	4,0	7,5	9,2	1,7	1,5	1,4
Neurosporin	2,6	4,6	5,2	0,7	0,3	0,3
γ-Carotin	20,1	31,1	12,6	2,4	1,9	1,8
Torulin	26,5	16,8	3,0	1,4	0,6	0,6
Lycopin	20,3	20,4	6,3	2,6	0,8	0,8
Neurosporax.	140	48,1	5,3	2,4	1,6	1,6

Tabelle 5: Vergleich der Farbstoffbildung mit und ohne Lichtinduktion bei Inkubation des Myzels mit verschiedenen DPA-Konzentrationen.

5. Der Einfluß des Lichtes auf die Bildung von Sterinen

Viele Pilze synthetisieren Sterine in relativ großen Mengen; bei Fusarium ist der Ergosteringehalt etwa 25 bis 50 mal größer als die Carotinoidmenge. Man könnte diese Tatsache so interpretieren, daß die Carotinoide gewissermaßen Produkte darstellen, die im Verlauf der Sterinsynthese "nur nebenbei" abfallen.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, ist der Syntheseweg der Sterine und der Carotinoide bis zum C_{15}-Körper Farnesyl-pyrophosphat der gleiche; nach dieser Stufe erfolgt die Verzweigung einerseits zur Sterinsynthese, welche über den C_{30}-Körper Squalen zum Hauptprodukt Ergosterin führt, und andererseits zur Carotinoidsynthese.

Auf Grund der bisher geschilderten Ergebnisse kann man annehmen, daß der Angriffspunkt des Lichtes bei der Carotinoidsynthese vor den in dieser Arbeit erfaßten C_{40}-Komponenten liegt. Setzt man diese Annahme als gegeben voraus, dann lassen sich zwei Möglichkeiten diskutieren: Entweder liegt die Angriffsstelle vor der C_{15}-Stufe, also vor der Verzweigung von Carotinoid- und Sterinbiosynthese, oder nach der C_{15}-Stufe im Bereich der Carotinoidvorstufe Geranyl-geraniolpyrophosphat. Im ersteren Fall müßte außer der Carotinoidbildung auch die Sterinsynthese durch Licht gefördert werden, im letzteren Fall dagegen nicht. Um einer Klärung dieser Frage näherzukommen, wurde die Bildung von Sterinen im Dunkeln und nach Lichtinduktion untersucht.

Wegen des hohen Steringehalts des Pilzmyzels wurde für diese Versuche die übliche Pilzsuspension auf das Doppelte verdünnt, je 50 ml mit der entsprechenden Puffer- und Glukosemenge in Gaswaschflaschen gefüllt, 3 Stunden lang unter ständiger Luftzufuhr belichtet und anschließend noch bis zu 96 Stunden nach Lichtbeginn im Dunkeln belassen; parallel dazu wurden andere Proben ohne Belichtung angesetzt. Zu verschiedenen Zeiten (60, 90, 120 und 180 Minuten und 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Versuchsbeginn) wurden Proben entnommen und ihr Steringehalt bestimmt.

Dazu wurde das Myzel in der bereits bei den Carotinoiden beschriebenen Weise extrahiert. Die Absorptionskurve der Sterine von Fusarium stimmt genau mit derjenigen von Ergosterin überein; es kann demnach angenommen werden, daß das Hauptprodukt der von Fusarium gebildeten Sterine Ergosterin ist. Als Maß für die Sterinmenge diente die Extinktion im Absorptionsmaximum (282 nm in Petroläther).

Der Steringehalt des Myzels war so groß, daß die Extrakte für die Extinktionsmessung im Vergleich zur Carotinoidbestimmung 25 bis 50 fach verdünnt werden mußten. Da in dieser Verdünnung die mitextrahierten Carotinoide nur noch in unmeßbar geringen Mengen vorhanden sind, konnte eine Absorption durch Carotinoide vernachlässigt werden. Zudem liegen die Absorptionsmaxima des Ergosterins (272 - 295 nm) von denen der gefärbten Carotinoide (400 - 485 nm) weit entfernt.
Der Verlauf der Sterinbildung im Dunkeln und nach Belichtung ist aus Abb.7 zu ersehen.

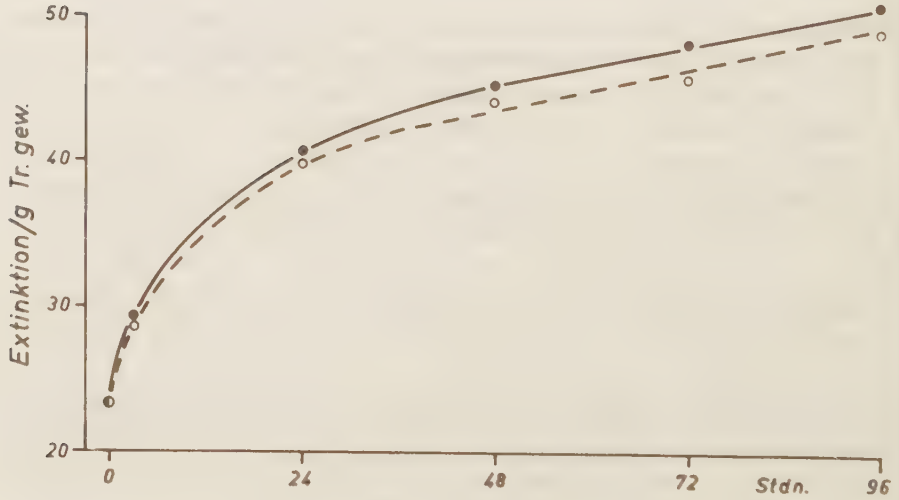


Abb.7: Verlauf der Sterinbildung im Dunkeln und nach Belichtung
—— • —— Dunkel
--- o --- nach 3 stündiger Belichtung
Abszisse: Zeit nach Beginn der Belichtung bzw. nach Versuchsbeginn

Die Ergebnisse zeigen, daß die Sterinsynthese durch Licht nicht gesteigert, sondern im Gegenteil während der ersten 36 bis 48 Stunden sogar etwas gehemmt wird.

Diese Tatsache ist ein Hinweis dafür, daß der Angriffspunkt des Lichtes in der Synthesekette wahrscheinlich nicht vor der C_{15}-Stufe liegt, sondern vielleicht nach der Abzweigungsstelle im Bereich der Carotinoidvorstufe Geranyl-geraniol-pyrophosphat, d.h. zwischen der C_{15}- und der ersten C_{40}-Stufe.

Der Unterschied zwischen den im Dunkeln und nach Belichtung gebildeten Sterinmengen beträgt von der 48. bis zur 96. Stunde nach Versuchsbeginn im Durchschnitt 1.600 Extinktionseinheiten; dies entspricht einer Ergosterinmenge von ca. 500 µg (KAKUTANI 1967). Dieser Betrag, um den die Sterinproduktion durch Belichtung herabgesetzt wurde, ist nun annähernd gleich der nach Belichtung gebildeten Carotinoidmenge von 360 µg. Man könnte daraus bei aller Vorsicht in der Interpretation den Schluß ziehen, daß durch die lichtinduzierte Carotinoidsynthese dem Sterinbiosyntheseweg die entsprechende Menge an Vorstufen entzogen wird.

Der mittlere Fehler bei der Bestimmung der Sterine ist im Verhältnis zum Unterschied der Sterinmengen zwischen belichteten und unbelichteten Proben allerdings so groß (Unterschied 3-5%; mittlerer Fehler ±1,1%), daß das Ergebnis nur als vorläufiger Hinweis gelten kann.

6. Die Wirkung von Actidion (Cycloheximid) auf die Bildung der einzelnen Komponenten des Carotinoidgemisches.

RILLING (1962,1964; BATRA und RILLING 1964) hatte bei Mycobacterium beobachtet, daß die lichtinduzierte Carotinoidsynthese

gebildete Enzyme werden durch das Gift in ihrer Wirkung nicht wesentlich beeinträchtigt; im vorliegenden Fall würde also die Farbstoffbildung nicht mehr gehemmt. Damit ist die Möglichkeit gegeben, durch Actidionzugabe zu verschiedenen Zeiten nach der Belichtung die Bildungsdauer der für die Synthese jedes einzelnen Carotinoids notwendigen Enzyme zu bestimmen und zwar indirekt über die Bildung des betreffenden Pigments selbst.

Nach Angaben von GOODWIN und Mitarb.(1967) und RAU (1967 b) ist bis zu einer Konzentration von 10^{-4} molar und bis zu einer Versuchsdauer von 48 Std keine Beeinträchtigung der Atmung (gemessen als O_2-Aufnahme im Warburgapparat) durch Actidion festzustellen. Weiterhin weist RAU (1967 b) darauf hin, daß bei Actidionzugabe 3 Std nach Beginn der Belichtung nahezu dieselbe Farbstoffmenge gebildet wird wie ohne Gift. Da gerade zu diesem Zeitpunkt die Farbstoffsynthese in vollem Umfang einsetzt, kann man daraus schließen, daß die für die Carotinoidsynthese notwendigen Enzyme und Vorstufen durch Actidion kaum beeinflußt werden, wenn sie einmal gebildet sind. Für die Möglichkeit, daß Actidion neben der Proteinsynthese auch noch andere Prozesse, z.B. die Transkription, hemmt, sprechen im Augenblick keine gesicherten Angaben aus der Literatur; eine solche Möglichkeit kann aber auch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Für die Versuche wurde die übliche Pilzsuspension verwendet; alle Proben wurden 30 Minuten lang belichtet und anschließend 36 Stunden zur Nachreaktion ins Dunkle gestellt. Jeweils 30 Minuten vor Beginn der Belichtung und 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten nach Einsetzen der Lichtinduktion wurde einzelnen Proben Actidion zugesetzt; eine Giftkonzentration von $4x10^{-5}$ molar hatte sich für die Unterdrückung der Pigmentpro-

duktion als ausreichend erwiesen (RAU 1967 b). Außerdem wurden Kontrollproben ohne Actidion mitgeführt. 36 Stunden nach Beginn der Belichtung wurde extrahiert und die Menge der einzelnen Carotinoide bestimmt. Die durch eine Belichtung induzierte Zunahme in Prozent der Kontrollen ohne Actidion ist für die einzelnen Carotinoide aus Abb.8 zu ersehen.

Die Werte lassen sehr klar erkennen, daß die Bildung aller Komponenten bei Actidionzugabe vor Beginn der Belichtung vollständig gehemmt wird. Setzt man das Gift aber erst 30 Minuten nach Lichtbeginn zu, dann werden bereits sämtliche Carotinoide synthetisiert; es müssen also zu diesem Zeitpunkt die Enzyme für die Synthese aller Pigmente vorhanden sein, allerdings in sehr verschieden großen Mengen. Im weiteren Verlauf der Kurven kommt die verschieden schnelle Synthese der Enzyme deutlich zum Ausdruck. Die Zeit nach Beginn der Lichtinduktion, innerhalb der die Synthese eines einzelnen Carotinoids noch gehemmt werden kann, beträgt für ζ-Carotin etwa 60 Minuten, für Neurosporin und γ-Carotin etwa 90 Minuten, für Torulin etwa 120 Minuten und für Neurosporaxanthin 150 Minuten; für Lycopin dauert sie noch länger.

Dieses Ergebnis zeigt in Übereinstimmung mit den Befunden von RILLING an Mycobacterium, daß die für die Bildung der einzelnen Carotinoide notwendigen Enzyme nicht alle gleichzeitig synthetisiert werden. Die Reihenfolge, in der die Synthese erfolgt, entspricht dem Grad der chemischen Sättigung der Pigmente. Mit Ausnahme der Stellung des Neurosporaxanthins entspricht das gesamte Kurvenbild dem des zeitlichen Verlaufs der Carotinoidsynthese in Abb.4.

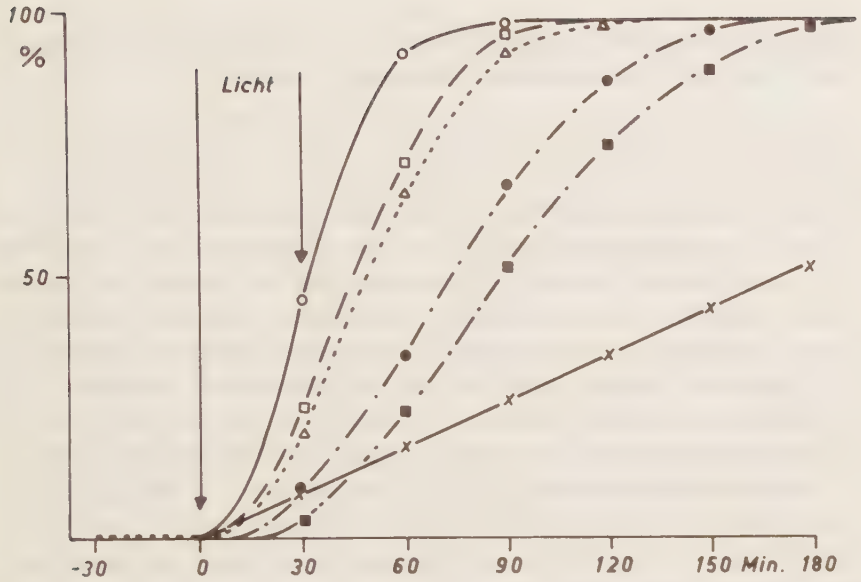


Abb.8: Bildung der einzelnen Carotinoide bei Actidionzugabe nach verschiedenen Zeiten. Abszisse: Zeit der Actidionzugabe (Endkonzentration $4x10^{-5}$molar) vor bzw. nach Beginn der Belichtung. Ordinate: Zunahme der Carotinoidmenge über den "Startwert" in Prozent der Kontrolle ohne Actidion. Mittelwerte aus 7 Versuchen.

——— o ——— ζ-Carotin
— — □ — — Neurosporin
- - - - - △ - - - - - β-Carotin
—·— ● —·— Torulin
—·— ■ —·— Neurosporaxanthin
——— x ——— Lycopin

7. Bildung der einzelnen Carotinoide bei Ersatz der Lichtinduktion durch Chloromercuribenzoat

RAU, FEUSER und RAU-HUND (1967) fanden bei dem Versuch, mit Hilfe von SH-Gruppengiften die Lichtinduktion bzw. die Carotinoidsynthese zu beeinflussen, daß bei Fusarium die Farbstoffbildung durch p-Chloro- und p- Hydroxy-Mercuribenzoat im Dunkeln induziert, also die Lichtwirkung durch das Gift ersetzt werden kann. Werden Suspensionen von Fusarium mit p-Chloromercuribenzoat (p-CMB) versetzt, so synthetisiert der Pilz im Verlauf von einigen Tagen trotz völliger Dunkelheit Farbstoffe in derselben Menge, wie sie nach einer Lichtinduktion auftreten. Weitere Untersuchungen (RAU 1967 b) haben ergeben, daß die maximale Pigmentbildung bei einer Konzentration von $4\text{-}6 \times 10^{-5}$ molar erreicht wird; sie läßt sich durch höhere Konzentrationen nicht mehr steigern. Ein Vergleich mit dem zeitlichen Verlauf der Farbstoffbildung nach Belichtung zeigte, daß sowohl die Induktion durch MB als auch der Vorgang der Carotinoidsynthese längere Zeit in Anspruch nimmt. Auch die durch MB induzierte Carotinoidsynthese ließ sich durch Actidion hemmen. Auf Grund seiner Ergebnisse diskutiert RAU die Möglichkeit, daß Licht und MB an der gleichen Stelle im Reaktionsmechanismus der Pigmentsynthese eingreifen.

Es wurde deshalb geprüft, ob nach Induktion der Pigmentsynthese durch MB die gleichen Carotinoide gebildet werden wie nach Lichtinduktion und ob sich eventuell quantitative Unterschiede ergeben. Bereits aus der verschiedenen Lage des Absorptionsmaximums des nach MB-Induktion gebildeten Farbstoffes gegenüber dem nach Lichtinduktion synthetisierten konnte geschlossen werden, daß zumindest die quantitative Zusammensetzung eine andere sein muß.

Die Pilzsuspension wurde mit CMB (Endkonzentration $4x10^{-5}$mol.) versetzt und in Gaswaschflaschen 96 Stunden lang bei völliger Dunkelheit ständig belüftet. Zur Kontrolle wurden jeweils Dunkelproben und belichtete Vergleichsproben ohne Gift mitgeführt.

Der Anteil der einzelnen Komponenten an dem nach Licht- bzw. nach CMB-Induktion gebildeten Farbstoff ist in Abb.9 dargestellt. Die Werte lassen erkennen, daß nach CMB-Induktion qualitativ die gleichen Carotinoide gebildet werden wie nach Lichtinduktion. Die vergleichende Zusammenstellung der Menge der einzelnen Carotinoide zeigt jedoch, daß die Zusammensetzung des Farbstoffs bei Inkubation mit CMB sehr verschieden ist von der nach Lichtinduktion. Während die Menge der ungesättigteren Komponenten (Lycopin und Neurosporaxanthin) bei einer CMB-Konzentration von $4x10^{-5}$molar geringer ist als nach Lichtinduktion, ist der Anteil an ζ-Carotin, Neurosporin, γ-Carotin und Torulin sehr viel höher. Auffallend ist der ungewöhnlich hohe Anteil an γ-Carotin; das Absorptionsmaximum von γ-Carotin bestimmt deshalb weitgehend das Absorptionsmaximum des "Gesamtfarbstoffes".

Die relative Anhäufung von γ-Carotin und Torulin, sowie der gesättigteren Komponenten ζ-Carotin und Neurosporin könnte durch eine Blockierung verursacht sein, die die Bildung der ungesättigteren Pigmente sehr deutlich einschränkt. Neurosporaxanthin wird zwar fast in der gleichen Menge gebildet wie γ-Carotin, ein Vergleich mit den belichteten CMB-freien Kontrollen zeigt jedoch immerhin noch eine Hemmung der Synthese um 18 %.

Bei einer geringeren CMB-Konzentration (10^{-5}molar) werden ζ-Carotin, Neurosporin, γ-Carotin und Lycopin etwa in der gleichen Menge wie nach Lichtinduktion gebildet; lediglich die Synthese von Torulin und Neurosporaxanthin ist noch stärker gehemmt.

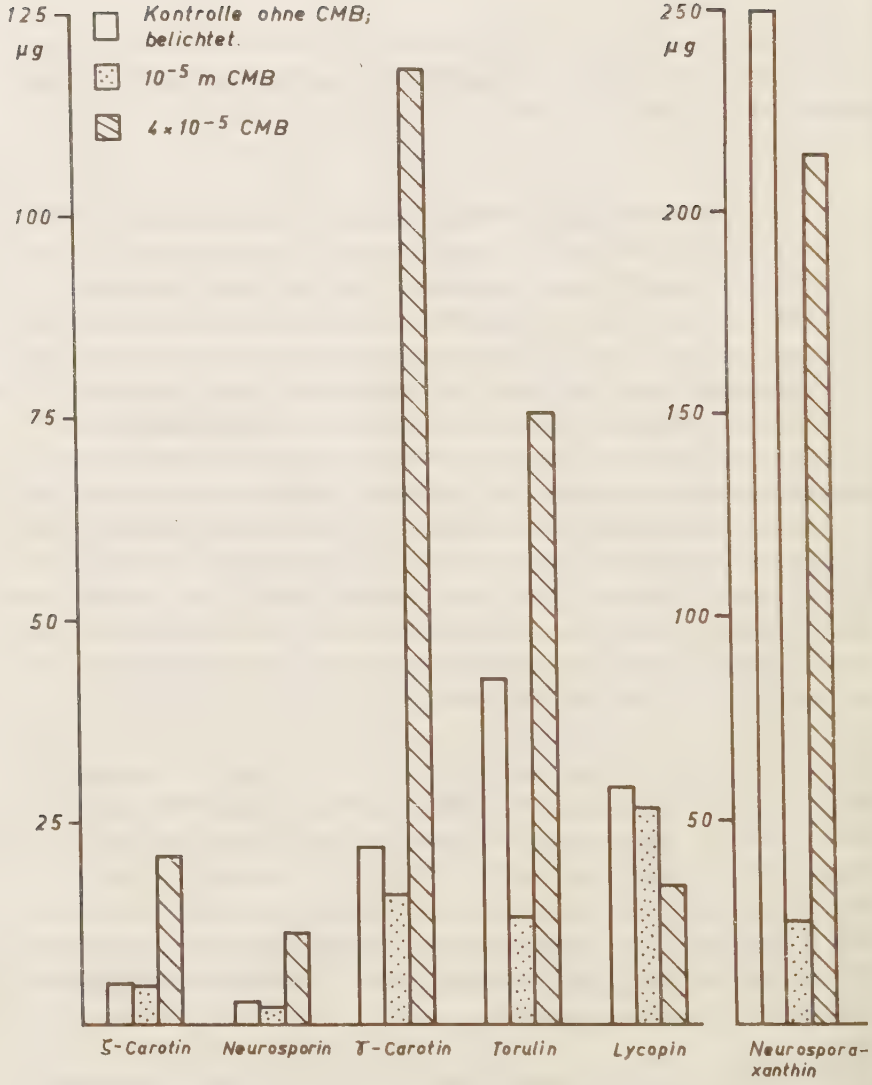


Abb.9: Carotinoidsynthese bei Inkubation mit Chloromercuribenzoat. Die Farbstoffmenge ist in µg pro g Trockengewicht angegeben. Die Kontrollproben wurden 2 Stunden belichtet.

D. DISKUSSION

Der Pilz Fusarium aquaeductuum bildet wie einige andere Mikroorganismen im Licht Carotinoide. Nach einer Lichtinduktion läuft die Synthese der Farbstoffe auch im Dunkeln ab; das Licht spielt also nur die Rolle eines Auslösers, für die Synthese selbst ist es nicht notwendig. Solche Regulationsvorgänge, bei denen eine bestimmte Syntheseleistung der Pflanze erst durch das Licht ausgelöst wird, sind im Pflanzenreich recht zahlreich; ihr Mechanismus wurde in den letzten Jahren unter anderem auch an lichtabhängigen Pigmentsynthesen, z.B. der Anthocyansynthese (MOHR 1966), der Chlorophyllsynthese (BJÖRN 1965, 1967) und an der Carotinoidsynthese (RILLING 1964, BATRA u. RILLING 1964, RAU 1967b) untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen sollten zur Klärung der Frage beitragen, an welcher Stelle im Biosyntheseweg der Carotinoide die durch das Licht ausgelösten Prozesse eingreifen.

Wie bereits in der Einleitung dargestellt wurde, gibt es für die Synthese der C_{40}-Polyene und gefärbten Carotinoide zwei Hypothesen: Nach PORTER und LINCOLN (1950) soll ihre Bildung durch schrittweise Dehydrierung, Ringbildung und Oxydation in einer Sequenz erfolgen, während nach anderen Autoren, neuerdings z.B. KARUNAKARAN und QUACKENBUSH (1966), alle Pigmente parallel aus einer gemeinsamen, ungefärbten Vorstufe entstehen sollen.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sprechen nun eindeutig für die Hypothese von PORTER und LINCOLN. Die mit der angewendeten Analysenmethode erfaßten Carotinoide steigen im

Dunkeln mit verschieden hoher, für jedes Pigment aber konstanten Syntheserate an; die Bildungsgeschwindigkeit wird nach Lichtinduktion drastisch erhöht. Wie vor allem aus Abb.4 zu erkennen ist, nimmt die Menge der einzelnen Carotinoide in einer zeitlichen Aufeinanderfolge zu; die Reihenfolge entspricht dabei dem abnehmenden Grad der chemischen Sättigung der Pigmente. Nicht nur die Farbstoffe selbst, sondern auch die für ihre Synthese notwendigen Enzyme werden, wie aus den Versuchen über die Hemmung der Pigmentsynthese durch Actidion hervorgeht (Abb.8), nacheinander gebildet; bei dieser Aussage wird vorausgesetzt, daß Actidion nur die Proteinsynthese und nicht auch noch andere Prozesse hemmt (siehe Bemerkungen bei Kap.6). Schließlich können als Stütze für unsere Auffassung auch noch die Befunde mit Diphenylamin angeführt werden; bei Inkubation des Pilzes mit diesem Gift wird die durch Licht induzierte Synthese bei den einzelnen Carotinoiden nicht im gleichen Maße gehemmt.

Wie verläuft nun bei Fusarium der Biosyntheseweg nach dem ersten C_{40}-Körper, dem Phytoen? Die vorliegenden Ergebnisse lassen darüber zwar keine endgültige Aussage zu; auf Grund der zeitlichen Aufeinanderfolge der Bildung der einzelnen Komponenten (Abb.4) und der zu ihrer Synthese notwendigen Enzyme (Abb.8), sowie an Hand ihres chemischen Baus könnte man jedoch in Anlehnung an das PORTER-ANDERSON-Schema und in Analogie zu den Ergebnissen an anderen Organismen (z.B.Neurospora, GROB 1959; Rhodopseudomonas, EIMHJELLEN und JENSEN 1964; Verticillium, VALADON und MUMMERY 1966) den in Abb.10 dargestellten Weg annehmen.

Die Sequenz, in der dabei die Carotinoide angeordnet sind, unterscheidet sich von der von PORTER und ANDERSON postulierten vor allem in der Stellung des Lycopins; es wird von

den genannten Autoren vor dem γ-Carotin eingereiht. Nach den Befunden dieser Arbeit kann aber mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß Lycopin eine Vorstufe von γ-Carotin ist. Dagegen spricht zunächst die Tatsache, daß im zeitlichen Verlauf der Farbstoffbildung nach Lichtinduktion γ-Carotin früher (Abb.3) und schneller (Abb.4) synthetisiert wird als Lycopin; das gleiche trifft für die Bildung der jeweiligen Enzyme zu (Abb.8). Eine früher einsetzende γ-Carotinsynthese hatte schon BÖHME (1962) unter anderen Versuchsbedingungen gefunden. Darüberhinaus sprechen aber auch die Ergebnisse der Versuche über die Hemmung der Carotinoidsynthese durch DPA und über ihre Induktion durch Mercuribenzoat für die angenommene Reihenfolge. So ist z.B. aus Abb.5 zu ersehen, daß bei einer DPA-Konzentration von 10^{-5}molar γ-Carotin zusammen mit ζ-Carotin und Neurosporin angestaut wird, Lycopin dagegen nicht. Induziert man die Farbstoffbildung durch Inkubation des Pilzes mit Chloromercuribenzoat, dann ist bei keiner der verwendeten Konzentrationen der Lycopingehalt höher als in den Kontrollen mit Lichtinduktion, während γ-Carotin bei einer Konzentration von $4x10^{-5}$mol. bis zu einer Menge von mehreren hundert Prozent über den Wert der Lichtkontrollen angehäuft wird.

Die aufgezählten Befunde lassen sich am besten erklären, wenn man innerhalb des Biosyntheseweges der Carotinoide bei Fusarium eine Verzweigung annimmt, wie sie auch von PORTER und ANDERSON in ihrem allgemeinen Schema postuliert wurde. Für die in Abb.10 gemachte Annahme, daß aus Neurosporin einerseits Lycopin und andererseits die Pigmentgruppe γ-Carotin-Torulin-Neurosporaxanthin gebildet werden, sprechen folgende Kriterien: Bei einer Hemmung der Farbstoffbildung mit DPA der Konzentration 10^{-5}mol. wird die Lycopinsynthese nicht, diejenige von Torulin und Neurosporaxanthin dagegen deutlich

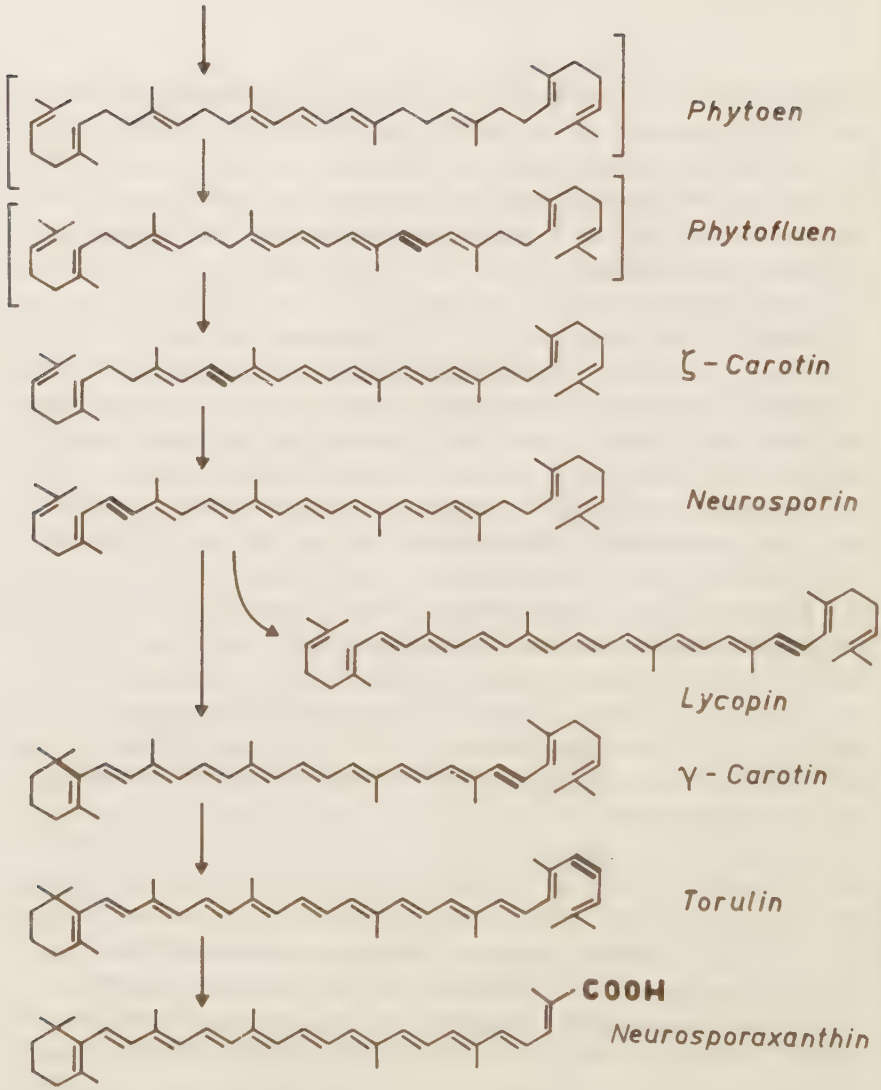


Abb.10: Angenommener Biosyntheseweg der Carotinoide bei Fusarium. Die in Klammern angeführten Polyene Phytoen und Phytofluen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht quantitativ bestimmt. Die fettgedruckten Bindungen und Gruppen bezeichnen die jeweilige Änderung am Molekül.

herabgesetzt; als Folge der gehemmten Torulin- und Neurosporaxanthinbildung häuft sich γ-Carotin neben den gesättigteren Carotinoiden an. Bei der Induktion der Pigmentsynthese durch Chloromercuribenzoat verhalten sich wiederum γ-Carotin, Torulin und Neurosporaxanthin sehr ähnlich.

Das Hauptproblem, auf das sich die vorliegende Arbeit konzentriert, war die Frage nach der Stelle im Biosyntheseweg der Carotinoide bei Fusarium, an der die durch das Licht in Gang gesetzten Vorgänge eingreifen. GROB (1959) hatte auf Grund seiner Versuche an Neurospora crassa angenommen, daß der durch Lichtinduktion zu überwindende Block etwa nach dem Neurosporin liegt. Der Befund, daß schon im Dunkeln alle Carotinoide vorliegen, die auch nach Lichtinduktion gebildet werden, sowie das Ergebnis, daß nach der Belichtung die Menge aller Komponenten zunimmt und nicht etwa ein im Dunkeln angestautes Pigment abgebaut wird, sprechen gegen die Annahme eines solchen Blocks innerhalb der mit unserer Analysenmethode erfaßten Komponenten.

Außerdem zeigt auch noch die Tatsache, daß die Synthese von ζ-Carotin und Neurosporin vor und 30 Minuten nach Beginn der Belichtung durch Actidion fast vollständig gehemmt wird, daß die für die Synthese dieser beiden Pigmente notwendigen Enzyme "de novo" gebildet werden; dies kann nur so gedeutet werden, daß die Enzymneubildung durch Licht induziert wird, daß also die durch das Licht ausgelösten Prozesse in der Synthesereihe vor dem ζ-Carotin eingreifen.

Die Ergebnisse der Versuche über die Hemmung der Carotinoidsynthese durch DPA im Dunkeln und nach Lichtinduktion sprechen für die folgende Interpretation: Durch die in unseren Versuchen verwendeten DPA-Konzentrationen wird die Pigment-

bildung nicht vollständig unterdrückt. Im Dunkeln kommt es zu einer Synthesehemmung aller Carotinoide; daß dabei keine der Komponenten angehäuft wird, hat seinen Grund darin, daß im Dunkeln der begrenzende Faktor für die Farbstoffbildung die Anlieferung von Carotinoidvorstufen ist. Wird durch Belichtung diese Vorstufenbildung stark erhöht, die weitere Synthese (innerhalb der gefärbten Carotinoide) ist aber durch das DPA nach wie vor nur in einem stark reduzierten Umfang möglich, dann muß es zu der beobachteten Anhäufung der gesättigteren Carotinoide kommen. Auf Grund der Tatsache, daß ein Anstau nur nach Belichtung erfolgt, nehmen wir deshalb an, daß das Licht zu einer Steigerung der Synthese von Carotinoidvorstufen führt. Die Frage, um welche Zwischenprodukte es sich handelt, muß zunächst noch unbeantwortet bleiben. Der Befund, daß die Sterinsynthese durch Licht nicht gefördert, sondern im Gegenteil sogar etwas herabgesetzt wird und daß der Betrag, um den die Sterinsynthese im Licht abnimmt, etwa der Menge der nach Belichtung gebildeten Carotinoide entspricht, gibt einen Anhaltspunkt dafür, daß die Lichtstimulierung nach dem Farnesyl-PP, dem letzten gemeinsamen Zwischenprodukt in der Sterin- und Carotinoidsynthese eingreift.

Nach den bisher besprochenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist es also wahrscheinlich, daß die durch das Licht in Gang gesetzten Prozesse im Biosyntheseweg der Carotinoide zwischen dem Farnesyl-PP und dem ζ-Carotin eingreifen. Mit dieser Aussage lassen sich nun aber die Ergebnisse der Actidion-Versuche nicht ohne weiteres in Einklang bringen. Unter den im Kap.6 dargelegten Voraussetzungen kann man nämlich annehmen, daß auch die für die Synthese derjenigen Carotinoide, die im Biosyntheseweg nach dem ζ-Carotin liegen, verantwortlichen Enzyme nach der Belichtung "de novo" gebildet werden. Zur Erklärung dieser Diskrepanz diskutiert RAU (1967b) die Möglichkeit, daß die Neubildung dieser Enzyme nicht durch Licht-, sondern

durch Substratinduktion erfolgt; als Substrat müßte jeweils das im Biosyntheseweg vorangehende Carotinoid betrachtet werden. Die rasche zeitliche Folge der Bildung der einzelnen Enzyme, sowie der Unterschied in der Länge der lag-Phasen bei der Enzymsynthese einerseits und der Carotinoidsynthese andererseits sind aber Anhaltspunkte, die gegen diese Auffassung sprechen.

In Analogie zu Ergebnissen an Bakterien könnte man auch noch an eine andere Erklärungsmöglichkeit denken. ALPERS und TOMKINS (1965,1966) fanden bei ihren Untersuchungen über das Lactose-Operon von Escherichia coli, das die Synthese von drei Enzymen codiert, daß nach Zugabe eines entsprechenden Induktors die drei Enzyme nicht gleichzeitig, sondern nacheinander erscheinen; das gleiche fanden GOLDBERGER und BERBERICH (1965) beim Histidin-Operon von Salmonella typhimurium. Die Autoren führen die zeitliche Sequenz der durch einen einzigen Induktor in Gang gesetzten Synthese mehrerer Enzyme auf einen Zeitunterschied bei der Transkription und Translation zurück.

Welche der beiden Möglichkeiten bei der lichtinduzierten Carotinoidsynthese von Fusarium verwirklicht sein könnte, läßt sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht entscheiden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese des Pilzes Fusarium aquaeductuum konzentrierten sich auf die Beantwortung der Frage, an welcher Stelle im Biosyntheseweg der Carotinoide die durch das Licht ausgelösten Prozesse eingreifen. Außerdem wurde versucht, Anhaltspunkte über den bisher unbekannten Biosyntheseweg der Carotinoide bei Fusarium zu gewinnen.

2. Der Farbstoff von Fusarium besteht aus einem Gemisch verschiedener Carotinoide, die säulenchromatographisch getrennt und auf Grund ihrer Absorptionsspektren in verschiedenen Lösungsmitteln, ihres chromatographischen Verhaltens und durch Vergleich mit den entsprechenden Pigmenten aus anderen Organismen identifiziert wurden. Folgende Carotinoide wurden gefunden: ζ-Carotin, Neurosporin, γ-Carotin, Torulin, Neurosporaxanthin und Lycopin.

3. Auch im Dunkeln bildet der Pilz Carotinoide in geringen Mengen und zwar alle Komponenten des Farbstoffgemisches, die auch im Licht gebildet werden; die Synthese läuft also im Dunkeln nicht nur bis zu einer bestimmten Stelle des Biosyntheseweges ab.

4. Belichtung des Myzels bewirkt eine kräftige Steigerung der Carotinoidsynthese. Die einzelnen Pigmente werden nach einer verschieden langen lag-Phase (etwa 30 bis 90 Minuten) in der Reihenfolge ihres abnehmenden Sättigungsgrades gebildet. Durch Zugabe des Proteinsynthesegiftes Actidion (Cycloheximid) zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Lichtinduktion konnte gezeigt werden, daß auch die für die Synthese der einzelnen Carotinoide verantwortli-

chen Enzyme in einer zeitlichen Sequenz gebildet werden. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, daß die Carotinoide nicht parallel aus einer gemeinsamen Vorstufe, sondern im Sinne des PORTER-LINCOLN-Schemas durch schrittweise Dehydrierung in einer Synthesereihe gebildet werden.

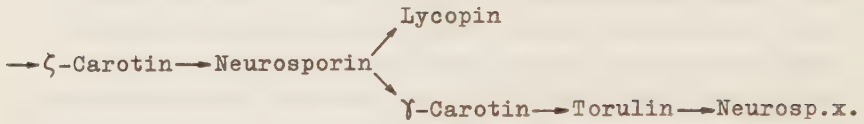
5. Die Lichtinduktion läßt sich durch Inkubation des Pilzes mit dem SH-Gruppengift Chloromercuribenzoat ersetzen. Dabei werden qualitativ die gleichen Carotinoide gebildet wie nach Belichtung; die quantitative Zusammensetzung des Farbstoffs ändert sich jedoch mit der Konzentration des Mercuribenzoats.

6. Diphenylamin hemmt im Dunkeln die Synthese aller Carotinoide. Nach Lichtinduktion wird jedoch die Bildung der einzelnen Pigmente nicht im gleichen Maße unterdrückt; ζ-Carotin, Neurosporin und γ-Carotin werden bei den verwendeten Konzentrationen 10^{-5}molar und $3{,}3 \times 10^{-5}$molar sogar angehäuft, die ungesättigteren Carotinoide wie Torulin, Lycopin und Neurosporaxanthin kaum gebildet. Aus der Tatsache, daß ein Anstau der gesättigteren Pigmente nur nach Belichtung erfolgt, wird geschlossen, daß das Licht zu einer Steigerung der Synthese von Carotinoidvorstufen führt.

7. Die Sterinsynthese wird durch Licht nicht gefördert, sondern im Gegenteil sogar etwas gehemmt.

8. Auf Grund der vorliegenden Befunde wird in Anlehnung an das PORTER-ANDERSON-Schema und in Analogie zu den Ergebnissen an anderen Organismen (z.B. Neurospora, GROB 1959; Rhodopseudomonas, EIMHJELLEN und JENSEN 1964; Verticillium, VALADON und MUMMERY 1966) folgender Biosyntheseweg

bei Fusarium angenommen:

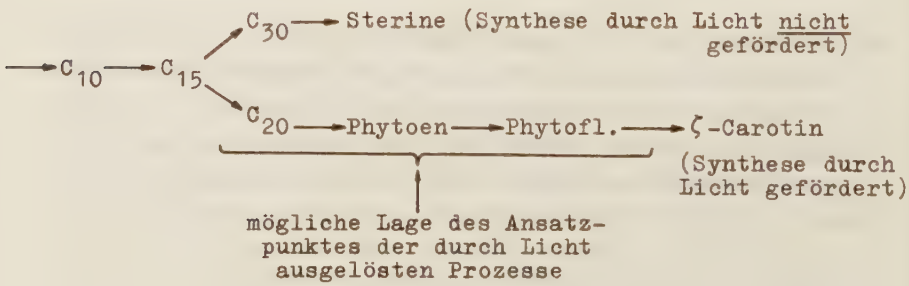


Für diesen Biosyntheseweg sprechen außer der zeitlichen Bildungssequenz von Carotinoiden und Enzymen auch noch die Versuche mit Diphenylamin.

9. Aus den Versuchsergebnissen läßt sich folgende hypothetische Aussage über die Stelle machen, an der die durch das Licht in Gang gesetzten Prozesse in den Biosyntheseweg der Carotinoide eingreifen:

Der Angriffspunkt des Lichtes liegt in der Synthesereihe der Carotinoide v o r den in dieser Arbeit erfaßten Carotinoidkomponenten, also vor dem ζ-Carotin. Für diese Annahme sprechen die Ergebnisse aus den Versuchen mit DPA und Actidion.

Die Tatsache, daß die Sterinsynthese vom Licht nicht gefördert, sondern im Gegenteil sogar etwas herabgesetzt wird, gibt einen Hinweis dafür, daß die Lichtstimulierung n a c h dem Farnesyl-PP, dem letzten gemeinsamen Zwischenprodukt in der Sterin- und Carotinoidsynthese liegt.



F. LITERATURVERZEICHNIS

AASEN, A.J., and S.L.JENSEN: Fungal carotenoids. II.The structure of the carotenoid acid neurosporaxanthin. Acta chim. Scand. 19, 1843-1853 (1965).

ALPERS, D.H., and G.M.TOMKINS: The order of induction and deinduction of the enzymes of the lactose operon in Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences 53, 797-803 (1965).

ALPERS, D.H., and G.M.TOMKINS: Sequential transcription of the genes of the lactose operon and its regulation by protein synthesis. J.biol.Chem. 241, 4434-4443 (1966).

BATRA, P.P., and H.C.RILLING: On the mechanism of photoinduced carotenoid synthesis: Aspects of the photoinductive reaction. Arch.Biochem. 107, 485-492 (1964).

BEELER, D.A., and J.W.PORTER: The enzymatic conversion of phytoene to phytofluene. Biochem.Biophys.Res.Commun. 8, 367-371 (1962).

BEELER, D.A., and J.W.PORTER: Specific radioactivities of carotenes synthesized from C^{14}-labeled terpenol pyrophosphates by isolated tomato plastids. Arch.Biochem.Biophys. 100, 167-170 (1963).

BERNHARD, K., und H.ALBRECHT: Die Lipide aus Phycomyces blakesleeanus. Helvet.Chim.Acta 31, 977-988 (1948).

BJÖRN, L.O.: Chlorophyll formation in excised wheat roots. Physiol.Plant. 18, 1130-1142 (1965).

BJÖRN, L.O.: The light requirement for different steps in the development of chloroplasts in excised wheat roots. Physiol.Plant. 20, 483-499 (1967).

BLOCH, K.: Biosynthese des Cholesterins. Angew.Chemie 77, 944-954 (1965).

BONNER, J., A.SANDOVAL, Y.W.TANG, and L.ZECHMEISTER: Changes in polyene synthesis induced by mutation in a red yeast (Rhodotorula rubra). Arch.Biochem. 10, 113-123 (1946).

BÖHME, U.: Untersuchungen über die Veränderungen der quantitativen Zusammensetzung der Pigmente von Fusarium aquaeductuum im Verlauf ihrer Entstehung. Dissertation München 1962.

DAVIES, B.H.: Analysis of carotenoid pigments in chemistry and biochemistry of plant pigments (edited by T.W. Goodwin). Academic Press, New York, 489-532 (1965).

EBERHARD, D., W.RAU und C.ZEHENDER: Über den Einfluß des Lichts auf die Carotinoidbildung von Fusarium aquaeductuum. Planta 56, 302-308 (1961).

EIMHJELLEN, K.E., and S.L.JENSEN: The biosynthesis of carotenoids in Rhodopseudomonas gelatinosa. Biochim.biophys.Acta 82, 21-40 (1964).

FRIEND, J., T.W.GOODWIN, and L.A.GRIFFITHS: The role of carboxylic acids in the biosynthesis of ß-carotene by Phycomyces bl. Biochem.J. 60, 649-655 (1955).

GARTON, G.A., T.W.GOODWIN, and W.LIJINSKY: General conditions governing ß-carotene synthesis by the fungus Phycomyces blakesleeanus. Biochem.J. 48, 154-163 (1951).

GOLDBERGER, R.F., and M.A.BERBERICH: Sequential repression and derepression of the enzymes for histidine biosynthesis in Salmonella typhimurium. Proceedings of the National Academy of Sciences 54, 279-286 (1965).

GOODWIN, T.W., and W.LIJINSKY: Carotene production by Phycomyces blakesleeanus. Biochem.J. 50, 268-273 (1951).

GOODWIN, T.W.: Identification of the minor polyene components of the fungus Phycomyces blakesleeanus and a study of their synthesis under various cultur conditions. Biochem.J. 50, 550-558 (1952).

GOODWIN, T.W., and J.S.WILLMER: Nitrogen metabolism and carotene synthesis in Phycomyces blakesleeanus. Biochem.J. 51, 213-217 (1952).

GOODWIN, T.W., M.JAMIKORN, and J.S.WILLMER: The mode of action diphenylamine in inhibiting carotenogenesis in Phycomyces blakesleeanus. Biochem.J. 53, 531-538 (1953).

GOODWIN, T.W.: Carotenoids. In modern methods of plant analysis. Peach Tracey 3, 272-311, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955).

GOODWIN, T.W.: Studies in carotenogenesis. 19.A survey of the polyenes in a number of ripe berries. Biochem. J. 62, 346-352 (1956).

GOODWIN, T.W.: Carotenoids. In Handbuch der Pflanzenphysiologie X, 186-222, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958).

GROB, E.C.: Über die Bildung der Carotinoide bei Neurospora crassa. Chimia (Aarau) 12, 86-88 (1958).

GROB, E.C.: The biosynthesis of carotenoids by micro-organisms. Ciba Foundation Symposium on Biosynthesis of Terpenes and Sterols, 267-276 (1959).

GROB, E.C., K.KIRCHNER und F.LYNEN: Neues über die Biosynthese der Carotinoide. Chimia (Aarau), 15, 308-310 (1961).

HAXO, F.: Studies on the carotenoid pigments of Neurospora. 1.Composition of the pigment. Arch.Biochem. 20, 400-421 (1949).

ISLER, O., und P.SCHUDEL: Carotine und Carotinoide. Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung 9, S.54. Steinkopff Darmstadt (1963).

KAKUTANI, Y.: Detection of some isoprenoids and the influence of diphenylamine on the biosynthesis of isoprenoid by Sporobolomyces shibatanus. J.Biochem. 61, 193-198 (1967).

KANDUTSCH, A.A., H.PAULUS, E.LEVIN, and K.BLOCH: Purification of geranylgeranyl pyrophosphate synthetase from Micrococcus lysodeikticus. J.biol.Chem. 239, 2507-2515 (1964).

KARUNAKARAN, A., M.E.KARUNAKARAN, and F.W.QUACKENBUSH: Carotenoid biosynthesis in Neurospora crassa: incorporation of 2-C^{14}-mevalonate during control of pigmentation by continuous culture. Arch. Biochem.Biophys. 114, 326-330 (1966).

KRZEMINSKI, L.F., and F.W.QUACKENBUSH: Stimulation of carotene synthesis in submerged cultures of Neurospora crassa by surface-active agents and ammonium nitrate. Arch.Biochem.Biophys. 88, 64-67 (1960).

KRZEMINSKI, L.F., and F.W.QUACKENBUSH: Incorporation of C^{14}-labeled compounds into carotenes by Neurospora crassa. Arch.Biochem.Biophys. 88, 287-293 (1960).

LYNEN, F.: Der Weg von der "aktivierten Essigsäure" zu den Terpenen und Fettsäuren. Angew.Chemie 77, 929-944 (1965).

MACKINNEY, G.: Carotenoids. Annual Review of Biochem. 21, 473-492 (1952).

MACKINNEY, G., C.O.CHICHESTER, and P.S.WONG: Carotenoids in Phycomyces. J.Amer.Chem.Soc. 75, S.5428 (1953).

MACKINNEY, G., C.O.CHICHESTER, and P.S.WONG: On carotenoid synthesis in Phycomyces blakesleeanus. Arch. Biochem.Biophys. 53, 479-483 (1954).

MASE, Y., W.J.RABOURN, and F.W.QUACKENBUSH: Carotene production by Penicillium sclerotiorum. Arch.Biochem.Biophys. 68, 150-156 (1957).

MOHR, H.: Untersuchungen zur phytochrominduzierten Photomorphogenese des Senfkeimlings (Sinapis alba L.). Z.Pflanzenphysiol. 54, 63-83 (1966).

NAKAYAMA, T.O.M.: The carotenoids of Rhodopseudomonas I,II. Arch.Biochem.Biophys. 75, 352-360 (1958).

NASH, H.A., F.W.QUACKENBUSH, and J.W.PORTER: Studies on the structure of ζ-carotene. J.Am.Chem.Soc. 70, 3613-3615 (1948).

PORTER, J.W., and R.E.LINCOLN: Lycopersicon selection containing a high content of carotenes and colorless polyenes II. The mechanism of carotene biosynthesis. Arch.Biochem. 27, 390-403 (1950).

PORTER, J.W., and D.G.ANDERSON: The biosynthesis of carotenes. Arch.Biochem.Biophys. 97, S.520 (1962).

PORTER, J.W., and D.G.ANDERSON: Biosynthesis of carotenes. Ann.Rev.Plant Physiol. 18, 197-228 (1967).

PRAUS, R.: A study on the biosynthesis of carotenoids in Rhodotorula gracilis. II.Effect of light on the formation and content of carotenoids. Chem.Listy 46, 643-645 (1952).

RAU, W., und C.ZEHENDER: Die Carotinoide von Fusarium aquaeductuum Lagh. Arch.Mikrobiol. 32, 423-428 (1959).

RAU, W.: Über den Einfluß der Temperatur auf die lichtabhängige Carotinoidbildung von Fusarium aquaeductuum. Planta 59, 123-137 (1962).

RAU, W.: Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. I.Das Wirkungsspektrum von Fusarium aquaeductuum. Planta 72, 14-28 (1967a).

RAU, W.: Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoidsynthese. II.Ersatz der Lichtinduktion durch Mercuribenzoat. Planta 74, 263-277 (1967b).

RAU, W., B.FEUSER, and A.RAU-HUND: Substitution of p-chloro- or p-hydroxymercuribenzoate for light in carotenoid synthesis by Fusarium aquaeductuum. Biochim.biophys.Acta (Amst.) (im Druck).

RILLING, H.C.: Photoinduction of carotenoid synthesis of a Mycobacterium sp. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 60, 548-556 (1962).

RILLING, H.C.: On the mechanism of photoinduction of carotenoid synthesis. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 79, 464-475 (1964).

RILLING, H.C.: A study of inhibition of carotenoid synthesis. Arch.Biochem.Biophys. 110, 39-46 (1965).

SALTON, M.R., and M.D.SCHMITT: Effects of diphenylamine on carotenoids and menaquinones in bacterial membranes. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 135, 196-207 (1967).

SAVARD, K., and G.A.GRANT: Ergosterol from mycelium of Penicillium notatum. Science 104, 459-460 (1946).

SIEGEL, M.R., and H.D.SISLER: Site of action of cycloheximid in cells of Saccharomyces pastorianus. I.Effect of the antibiotic on cellular metabolism. Biochim.biophys.Acta (Amst.) 87, 70-83 (1964).

SIMPSON, K.L., T.O.M.NAKAYAMA, and C.O.CHICHESTER: Biosynthesis of yeast carotenoids. J.Bacteriol. 88, 1688-1694 (1964).

SIMPSON, K.L., T.O.M.NAKAYAMA, and C.O.CHICHESTER: The biosynthetic origin of the carboxyl oxygen atoms of the carotenoid pigment torularhodin. Biochem.J. 92, 508-511 (1964).

SUZUE, G.: On the enzymatic synthesis of bacterial phytoene from 2-C^{14} mevalonic acid. J.Biochem. 51, 246-252 (1962).

STAHL, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).

STEINER, M.: Die Fette der Pilze. Handbuch der Pfl.physiol. VII. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1957).

THOMAS, D.M., and T.W.GOODWIN: Studies on carotenogenesis in Blakeslea trispora-I. General observations on synthesis in mated and unmated strains. Phytochem. 6, 355-360 (1967).

THOMAS, D.M., R.J.HARRIES, J.T.O.KIRK, and T.W.GOODWIN: Studies on carotenogenesis in Blakeslea trispora-II. The mode of action of trisporic acid. Phytochem. 6, 361-366 (1967).

TURIAN, G., and F.HAXO: Further use of diphenylamine for the study of carotenoid biosynthesis in Mycobacterium phlei. J.Bacteriol. 63, 690-691 (1952).

TURIAN, G., and F.HAXO: Minor polyene components in the sexual phase of Allomyces javanicus. Bot.Gaz. 115, 254-260 (1954).

TURIAN, G.: Recherches sur l'action anticaroténogène de la diphénylamine et ses conséquences sur la morphogenèse reproductive chez Allomyces et Neurospora. Physiol.Plantarum (Copenh.) 10, 667-680 (1957).

VALADON, L.R.G., and R.S.MUMMERY: Inhibition of carotenoid synthesis in a mutant of Verticillium albo-atrum. J.gen.Microbiol. 45, 531-540 (1966).

VILLOUTREIX, J.: Sur les Caroténoides d'une Levure Rouge: Rhodotorula mucilaginosa (Jorg) Harrison. Nancy: Imprimerie Grandville (1960).

WILLIAMS, R.J.H., B.H.DAVIES, and T.W.GOODWIN: The presence of ß-zeacarotene in cultures of diphenylamine-inhibited Phycomyces blakesleeanus. Phytochem. 4, 759-760 (1965).

ZALOKAR, M.: Studies on biosynthesis of carotenoids in Neurospora crassa. Arch.Biochem.Biophys. 50, 71-80 (1954).

ZALOKAR, M.: Biosynthesis of carotenoids in Neurospora. Action spectrum of photoactivation. Arch.Biochem.Biophys. 70, 318-325 (1955).

ZECHMEISTER, L.: Cis-trans isomeric carotenoids, vitamins A and arylpolyenes. Springer-Verlag, Wien (1962).

Herrn Privatdozent Dr.W.Rau möchte
ich für die Überlassung des Themas,
ebenso für seine vielen Anregungen
und Ratschläge, für sein großes Ent-
gegenkommen und seine stetige Hilfs-
bereitschaft herzlich danken.

L e b e n s l a u f

Am 3. Januar 1940 wurde ich, Elmar Bindl, als drittes Kind des damaligen Hauptlehrers, späteren Rektors Wilhelm Bindl und seiner Ehefrau Franziska, geborene Nothaft, in Laaberberg Krs. Rottenburg/Laber geboren. Von 1946-1949 besuchte ich die Volksschule in Laaberberg; nach dem Umzug meiner Eltern nach Haidlfing Krs. Landau/Isar im Jahre 1949 besuchte ich die dortige Volksschule weiter. 1952 trat ich in das Deutsche Gymnasium in Straubing ein und legte 1959 an dieser Schule die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1959/60 immatrikulierte ich mich an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München. 1965 bestand ich das Staatsexamen für das Lehramt an Höheren Schulen in den Fächern Chemie, Biologie und Geographie. Unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr.W.Rau begann ich im selben Jahr im Botanischen Institut der Universität München mit der vorliegenden Arbeit. Am gleichen Institut war ich im Jahre 1965 und 1966 als wissenschaftliche Hilfskraft angestellt. Im Dezember 1966 trat ich den Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Höheren Schulen am Pädagogischen Seminar des Asam-Gymnasiums in München an, seit September 1967 bin ich Studienreferendar am Anton Bruckner Gymnasium in Straubing.